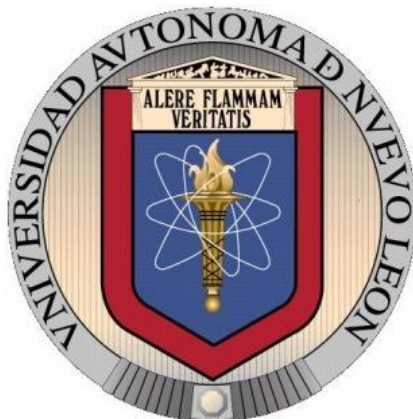


**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA POLIGUANIDINA CONJUGADA
(CATDEX), LASER FOTOTÉRMICO Y FOTOCOAGULACIÓN
MEDIANTE IMAGENOLÓGÍA 3D EN OSTEONECROSIS MANDIBULAR
INDUCIDA POR BIFOSFONATOS EN RATAS WISTAR.
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN VIVO**

POR

DR. ARQUÍMEDES CANTORÁN CASTILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL**

MAYO 2016

**UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE NUEVO LEÓN
FACULTAD DE ODONTOLOGÍA**



**COMPARACIÓN DEL EFECTO DE LA POLIGUANIDINA CONJUGADA
(CATDEX), LASER FOTOTÉRMICO Y FOTOCOAGULACIÓN
MEDIANTE IMAGENOLÓGÍA 3D EN OSTEONECROSIS MANDIBULAR
INDUCIDA POR BIFOSFONATOS EN RATAS WISTAR.
ESTUDIO EXPERIMENTAL EN VIVO**

POR

DR. ARQUÍMEDES CANTORÁN CASTILLO

**COMO REQUISITO PARA OBTENER EL GRADO DE
ESPECIALIZACIÓN EN CIRUGÍA ORAL Y MAXILOFACIAL**

MAYO 2016

**COMPARACION DEL EFECTO DE LA POLIGUANIDINA CONJUGADA
(CATDEX), LASER FOTOTERMICO Y FOTOCOAGULACION MEDIANTE
IMAGENOLOGIA 3D EN OSTEONECROSIS MANDIBULAR INDUCIDA POR
BIFOSFONATOS EN RATAS WISTAR**

ESTUDIO EXPERIMENTAL *EN VIVO*

Comité de Tesis

Dra. Belinda Ivett Beltrán Salinas

Directora de Tesis

Dra. Myriam Angélica De La Garza Ramos

Co- Director de Tesis.

Dr. Mario A. Guzmán García

Asesor

**COMPARACION DEL EFECTO DE LA POLIGUANIDINA CONJUGADA
(CATDEX), LASER FOTOTERMICO Y FOTOCOAGULACION MEDIANTE
IMAGENOLOGIA 3D EN OSTEONECROSIS MANDIBULAR INDUCIDA POR
BIFOSFONATOS EN RATAS WISTAR**

ESTUDIO EXPERIMENTAL *EN VIVO*

Asesores:

Prof. Dra. Marcela Márquez-Holmberg

Asesor de Experimentos

AGRADECIMIENTOS

Quiero agradecer a Dios por haberme acompañado y guiado a lo largo de mi especialidad, por proteger a mi familia y por poner a las personas indicadas durante mi trayecto de profesionista, gracias a mis familiares y amigos que siempre estuvieron ahí cuando más las necesitaba.

Quiero agradecer a mis Padres, por todo el apoyo incondicional que me han dado, por sus grandes consejos y enseñanzas, por sus palabras llenas de aliento y sabiduría, por ser mi fortaleza en momentos de debilidad.

A mi Esposa, mi amor incondicional por llenar mi vida de grandes momentos, por el apoyo y animo que siempre me brinda para alcanzar nuevas y mejores metas, por estar siempre conmigo en todo momento, gracias por tu paciencia y comprensión, hoy hemos alcanzado un triunfo más porque los dos somos uno, y mis logros son tuyos.

A mis Hermanas por ser una parte importante de mi vida, por haberme apoyado en las buenas y en las malas, y sobre todo por su paciencia y amor incondicional.

Les agradezco la confianza, apoyo y dedicación a mis Maestros: Dra. Belinda Beltrán, Dr. Cesar Villalpando, Dr. Adolfo Uribe, Dr. Armando Cervantes, por haber compartido conmigo sus conocimientos y virtudes, por guiarme por el camino adecuado durante la Residencia.

A mis compañeros de Residencia por su apoyo durante mi estancia en la especialidad, muchas gracias por brindarme su apoyo a lo largo de esta trayectoria, gracias por su motivación y optimismo en todo momento.

A la Dra. Marcela Márquez y al Dr. Anders Holmberg del instituto Karolinska Suecia por sus asesorías y por permitirnos trabajar con su producto en esta investigación.

Al Dr. Raúl Perales por el apoyo con las imágenes en 3D de esta investigación. Al Dr. Ricardo Martínez por su dedicación y participación en la interpretación de la histopatología.

Al Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS), al Dr. Mario Guzmán, Dra. Alejandra González y al Dr. José Herrera por permitirme el uso de sus instalaciones y por su ayuda en el laboratorio y el manejo de los animales usados para esta investigación.

ABREVIATURAS

CATDEX	Poliguanidina conjugada
BONJ	Osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos
CONE BEAM	Estudio en tercera dimensión
OMS	Organización Mundial de la Salud
AINE	Analgésico Antiinflamatorio no Esteroideo
BIFOSFONATO	Fármaco análogo no metabolizado de los pirofosfatos endógenos.
ZA	Acido Zolendrónico
PAD	Desinfección Fotoactivada (láser)
LLLT	Terapia con láser de bajo nivel

TABLA DE CONTENIDO

Sección	Página
RESUMEN.....	7
INTRODUCCION.....	10
PLANTEAMIENTO DEL PROBLEMA.....	12
ANTECEDENTES.....	17
MATERIALES Y METODOS.....	27
TAMANO DE MUESTRA.....	28
CARACTERISTICAS DE LOS GRUPOS EXPERIMENTALES.....	28
DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO	33
• IMÁGENES DEL MODELO ANIMAL.....	40
RESULTADOS.....	46
• ESTADISTICOS.....	47
• IMAGENOLOGICO.....	47
• BACTERIANO.....	50
DISCUSION.....	62
CONCLUSION.....	64
REFERENCIAS.....	67
ANEXOS.....	72

RESUMEN

Dr. Arquímedes Cantorán Castillo

Mayo 2016

Universidad Autónoma de Nuevo León

Facultad de Odontología

Título del estudio: Comparación Del Efecto De La Poliguanidina Conjugada (Catdex), Láser Fototérmico Y Fotocoagulación Mediante Imagenología 3D En Osteonecrosis Mandibular Inducida Por Bifosfonatos En Ratas Wistar. Estudio Experimental *en Vivo*.

Los bifosfonatos son fármacos análogos no metabolizados de los pirofosfatos endógenos, capaces de fijarse al hueso e inhibir la función de los osteoclastos, reduciendo el recambio óseo y disminuyendo el remodelado activo en los lugares donde existe una reabsorción ósea excesiva.

Los bifosfonatos se han utilizado durante más de 40 años para el tratamiento de trastornos del esqueleto como: la osteoporosis posmenopáusica y / o inducida por cortico esteroides enfermedad de Paget, en la metástasis ósea del cáncer de mama y de próstata y mieloma múltiple (*Migliorati, et al., 2005; Xu et al., 2013*). Estos efectos terapéuticos se alcanzan mediante la inducción de la apoptosis de las células tumorales, inhibiendo su adhesión a la matriz extracelular y la reducción del potencial metastásico mediante la inhibición de la angiogénesis (*Basi et al., 2008; Marx et al., 2012*). A pesar de los beneficios obtenidos con estos fármacos, estas drogas ponen a los pacientes en alto riesgo de desarrollar osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos (BONJ) posterior a alguna extracción dental u osteotomía mandibular, dejando el hueso expuesto y progresando a la osteomielitis con el secuestro, puede haber inflamación y supuración en tejidos circundantes (*Marx et al., 2012*).

Objetivo. Se ha postulado que una posible activación para la osteonecrosis inducida por bifosfonatos (BONJ) es una infección bacteriana del hueso que resulta de la exposición ósea a la cavidad oral posterior a la extracción (*Mawardi et al., 2011*). Por lo tanto, es probable que la inhibición de las bacterias por medio de tres métodos novedosos propuestos, incluyendo Catdex, terapia fototérmica y la fotocoagulación con láser, podría reducir el riesgo de osteonecrosis en un modelo animal de ratas Wistar.

Materiales y métodos. En el presente estudio se emplearon 36 ratas Wistar machos, 8 semanas de edad, divididos en 6 grupos (n = 6/ grupo), que se le administró ácido zoledrónico como bifosfonato a una dosis de 1 mg/ kg/ semana intravenosa, durante 6 semanas, seguido por la inoculación directa con bacteria *S. gordonii* y el se administró el tratamiento asignado para cada grupo experimental., (Catdex, terapia fototérmica láser, terapia de fotocoagulación con láser). Además, un grupo de control de tratamiento siguió un régimen antibacteriano con clindamicina, un grupo de control positivo no recibió tratamiento antibacteriano y un grupo de control negativo no se inoculó con bacterias. Se analizaron y compararon los resultados obtenidos de la densidad ósea mandibular en unidades Hounsfield de la imagenología en 3D (ConeBeam) de cada uno de los grupos con su respectivo tratamiento asignado.

Impacto-Beneficio. Alrededor del 10% de los pacientes con cáncer tratados con bifosfonatos están en alto riesgo de desarrollar osteonecrosis mandibular inducida por estos fármacos, sobre todo después de un traumatismo oral tales como la extracción dental u osteoplastias. Esta condición tiene consecuencias devastadoras sobre la calidad de vida de los pacientes como el dolor, molestias, una dieta insatisfactoria, comida interrumpidas, irritabilidad, ansiedad, depresión, disminución de la satisfacción con su vida (*Miksad et al., 2011*). Por otra parte, este problema se extiende a otro tipo de enfermedades óseas tales como osteoporosis, enfermedad de Paget y la displasia fibrosa (*Bi et al., 2010*).

La búsqueda de métodos eficaces para reducir el riesgo de BONJ en pacientes que requieren cirugía puede mejorar su pronóstico y sus resultados clínicos.

El presente proyecto se centró en identificar y probar nuevas terapias para encontrar una solución a éste difícil problema dentro de un equipo multidisciplinario.

Contribuciones y Conclusiones

En nuestro modelo de investigación animal con ratas Wistar se observó que la administración de Ácido Zolendróico por vía intravenosa durante 4 semanas antes y 3 semanas después de la osteotomía en la región mandibular del lado izquierdo, hubo alteraciones clínicas como fue el retraso en la cicatrización con ligera exposición de tejido óseo con ligera epitelización en la periferia de la osteotomía. Situación compatible con osteonecrosis mandibular por bifosfonatos similar a la que se produce en humanos según la Asociación Americana de Cirugía Oral y Maxilofacial.

Con las dosis y tiempos empleados en nuestro estudio hubo algunos cambios en la densidad ósea del lado izquierdo (lado afectado) en comparación con el lado derecho (lado no afectado) como consecuencia de la administración por vía intravenosa del bifosfonato (Ácido Zolendróico), la administración por vía intravenosa tiene mayor probabilidad de presentar osteonecrosis mandibular y alteraciones sistémicas. Se analizó los cambios en la densidad ósea mediante la obtención de las unidades Hounsfield de la imagenología en 3D (Cone Beam).

En un futuro, se necesitarían hacer más estudios con bifosfonatos, en diferentes dosis, vías de administración e intervalos, para comprender mejor la aparición de la osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos.

INTRODUCCION

La osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos (BONJ) es un efecto secundario muy común hoy en día debido a la alta incidencia de enfermedades crónicas como la osteoporosis, la enfermedad de Paget, el mieloma múltiple y algunos trastornos durante la menopausia, cuyo tratamiento consiste en la administración vía oral o intravenosa de bifosfonatos durante un periodo prolongado, aumentando la probabilidad de padecer este efecto secundario y disminuir la calidad de vida de nuestros pacientes si no es detectado a tiempo. Por lo que, es de gran interés para nuestra población en la actualidad, debemos saber prevenir, diagnosticar y elegir el tratamiento más adecuado para los pacientes que sufren BONJ o que se encuentran bajo esta administración de fármacos.

Uno de los principales motivos de consulta del Cirujano Maxilofacial es la osteonecrosis mandibular en pacientes bajo tratamiento con Bifosfonatos debido a que hoy en día más del 10% de los pacientes que se administran estos fármacos, tienen una alta probabilidad de padecer osteonecrosis mandibular, y la falta de conocimiento sobre el diagnóstico y plan de tratamiento de este efecto secundario, hace que esta enfermedad evolucione poco a poco al ser asintomática, aumentando la posibilidad de un tratamiento quirúrgico más agresivo en un futuro, con posibles daños psicológicos y sociales importantes.

Existen algunos estudios de laboratorio y teorías con modelos de estudio animal realizados acerca del uso de los bifosfonatos para poder inducir la osteonecrosis mandibular, sin embargo, hoy en día no existe un estudio que pueda comprobar mediante imagenología en tercera dimensión que tipo de tratamiento nos puede ayudar a prevenir la osteonecrosis mandibular.

Con base en las teorías y experimentos antes mencionados, se hizo énfasis en este estudio, en la administración por vía intravenosa del bifosfonato durante un intervalo de tiempo para poder simular la inactivación de la remodelación ósea por la disminución de la función de los osteoclastos que induce este fármaco, y mediante la realización de osteotomía simulando una extracción dental y posterior inoculación de *S. gordonii* de manera local en el área bucal al poder inducir la osteonecrosis mandibular inducida por

bifosfonatos (BONJ), y posteriormente administramos el tratamiento asignado para cada grupo.

Los resultados de este grupo nos proporcionaran un panorama más amplio de los nuevos enfoques que intentan interactuar y con la información obtenida podremos prevenir o elegir el plan de tratamiento que mejor funcione para nuestros pacientes con BONJ.

También nos enfocamos en dar nuevas ideas para continuar diferentes líneas de investigación de la osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos al personal docente y estudiantes interesados en el tema.

Planteamiento del Problema

En los últimos años se ha observado un aumento de la incidencia de osteonecrosis mandibular, mucho de estos casos son relacionados a problemas sistémicos como osteoporosis, cáncer, mieloma, los cuales sus tratamientos a base de bifosfonatos pueden ayudar a promover el desarrollo de la osteonecrosis asociada principalmente a bacterias de la cavidad oral.

Hoy en día, la búsqueda de nuevas alternativas terapéuticas nos hace proponer diferentes esquemas para la cura de diferentes patologías como lo es la osteonecrosis, que hasta hoy en día se tratan solamente con fármacos que ayudan a eliminar microorganismos.

La fotodinamia, y la fotocoagulación han demostrado ser una buena propuesta para eliminar patógenos ya que en diferentes estudios se ha demostrado su eficacia.

Por otra parte, el Catdex es un medicamento desarrollado para el tratamiento de cáncer y que, además, se ha observado que puede ser una alternativa de tratamiento ya que en algunos reportes se ha observado su fuerte efecto terapéutico hacia algunas bacterias de la cavidad oral.

Por todo lo anterior nos hemos planteado la siguiente pregunta de investigación:

¿Cuál es el efecto terapéutico de la fotodinamia, fotocoagulación y el uso del Catdex frente a un modelo experimental de osteonecrosis en ratas Wistar?

JUSTIFICACION

En la actualidad en los EE.UU. aproximadamente el 40% de mujeres blancas y el 13% de hombres de 50 y más años de edad padecen de osteoporosis y se encuentran bajo tratamiento con bifosfonatos por alteraciones óseas (*Spivacow et al., 2010*) , por lo que existe riesgo de desarrollar osteonecrosis de los maxilares, considerándose un problema de impacto mundial existen algunas recomendaciones acerca de la prevención y el manejo de este tipo de patologías, sin embargo, no existe un tratamiento efectivo o definitivo para la prevención y tratamiento de los pacientes con osteonecrosis de los maxilares inducido por bifosfonatos.

Hoy en día, debido a la controversia del tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos es importante considerar al Catdex para efecto antimicrobiano, así como el sellado mediante fotodinamia en el lugar de la osteotomía, evitando la colonización de las bacterias, conservando el periostio, formando una barrera, de manera que ayudara a una cicatrización adecuada en procedimientos en pacientes que se encuentran bajo tratamiento con bifosfonatos.

OBJETIVO GENERAL

Comparar el efecto preventivo/terapéutico del Catdex, la fotodinamia y la fotocoagulación para el manejo de osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos mediante la imagenología en 3D (Cone Beam). Estudio Comparativo

HIPOTESIS

“El láser Fototérmico, la fotocoagulación y el Catdex pueden ser considerados como un tratamiento eficiente para limitar la osteonecrosis inducida por bifosfonatos en comparación con el uso de antibióticos vía intramuscular.”

Hipótesis nula

El láser, el Catdex no son un tratamiento efectivo para la osteonecrosis inducida por bifosfonatos.

Hipótesis alterna

- A. La reducción de la infección por *Streptococcus* después de la osteotomía mandibular, puede reducir el riesgo de BONJ en ratas tratadas con bifosfonatos
- B. La infección por *Streptococcus* se puede reducir de manera efectiva en las ratas tratadas con bifosfonatos (ZA) usando la Fototermia láser, fotocoagulación o el Catdex y que éstos tratamientos son más eficaces que la terapia estándar con clindamicina.
- C. El Catdex es más efectivo para el tratamiento preventivo de la osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos.
- D. La terapia láser es un mejor método para el tratamiento preventivo de la Osteonecrosis de los maxilares comparado con el Catdex.
- E. La antibioticoterapia vía intramuscular es más efectiva que el Catdex y la terapia laser en el tratamiento de la osteonecrosis de los maxilares inducida por bifosfonatos.

1.1 Objetivos Específicos

- 1.-Desarrollar un modelo de osteonecrosis mandibular, inducido mediante la administración de bifosfonatos en ratas Wistar.
- 2.-Aplicar métodos terapéuticos utilizando terapia laser (Diodo), Catdex en área de osteotomías mandibulares en BONJ.
- 3.- Comparar y analizar resultados obtenidos entre los métodos de Catdex, terapia laser y antibioticos vía intramuscular mediante imagenología 3D (Cone Beam).
- 4.- Validar que el riesgo de infección por *S. gordonii* en BONJ en un modelo de rata se puede reducir.
- 5.- Validar que la terapia con láser se puede utilizar para reducir el riesgo de desarrollar BONJ en un modelo de rata.

Clasificación del Estudio:

- Experimental.,
- Prospectivo
- Longitudinal.,
- comparativo

ANTECEDENTES

Los bifosfonatos son fármacos análogos no metabolizados de los pirofosfatos endógenos, capaces de fijarse al hueso e inhibir la función de los osteoclastos, reduciendo el recambio óseo y disminuyendo el remodelado activo en los lugares donde existe una reabsorción ósea excesiva.

Los bifosfonatos presentan en su composición química dos átomos de fósforo unidos a un átomo de carbono (P-C-P). Esta estructura les confiere una resistencia al., hidrólisis enzimática y les permite fijarse con gran avidez a la superficie de los cristales de hidroxiapatita con una rápida y eficiente unión del fármaco a la superficie mineral ósea. Su acción primordial consiste en inhibir la reabsorción ósea mediante la supresión de la actividad de los osteoclastos (*Ellemann et al., 1989*).

En función de su composición química se emplean dos tipos de bifosfonatos: nitrogenados y no nitrogenados. El primer grupo incluye el pamidronato, zoledronato, alendronato, ibandronato y risedronato, éstos son más potentes, acumulándose en el hueso, pudiendo causar necrosis ósea. Dentro de los no nitrogenados se encuentra el etidronato, clodronato y tiludronato, son fármacos rápidamente metabolizados por los osteoclastos induciendo su apoptosis.

Los bifosfonatos son utilizados desde hace más de tres décadas para el tratamiento de los desórdenes esqueléticos como la osteoporosis postmenopáusica, en la enfermedad de Paget, en la hipercalcemia asociada a neoplasias, en metástasis óseas del cáncer de mama y de próstata y en el mieloma múltiple. Además, tienen efectos indirectos sobre el crecimiento de células tumoral es en el hueso, mediante la inhibición de la resorción ósea y la osteoclastogénesis.

Inducen la apoptosis de las células tumorales, inhiben la adhesión de estas células a la matriz extracelular y reducen el potencial metastásico inhibiendo la angiogénesis. Los bifosfonatos orales son menos potentes que los endovenosos.

A pesar de que los bifosfonatos fueron sintetizados en el siglo XIX, el conocimiento sobre sus características biológicas data desde la década de 1960. En el pasado, estos componentes fueron utilizados para múltiples propósitos industriales, como agente anti-sedimentación y para prevenir la formación de carbonato de calcio.

En el año de 1865, el Profesor Fleisch y colaboradores observaron que el pirofosfato llevaba cristales de fosfato para el calcio impidiendo la formación de cristal,es y disolución *in vitro*. En colaboración con Francis y Russell, mostraron que los análogos de los pirofosfatos, denominados en la época como bifosfonatos, interactuaban de forma similar al fosfato de calcio *in vitro*, inhibiendo tanto la mineralización como la reabsorción ósea animal(*Fleisch et al.,1969*).

En 1969 se publicó por primera vez sobre los bifosfonatos en la revista *Science and Nature*, veinte años más tarde estos elementos fueron utilizados como medicinas para disfunciones óseas.

En la investigación de *Berenson et al.,1998*se observó que el uso de Pamidronato mejoraba la supervivencia y disminuía las complicaciones óseas. Los estudios de Bereson y otros llevaron a la popularidad el uso de estas medicinas de forma indefinida (*Berenson et al., 1996, 2001*). Siendo así, los bifosfonatos como análogos de pirofosfato, inhiben la liberación de calcio e inhibe el crecimiento de osteoclastos, permitiendo su uso en el control de lesiones malignas metastásicas, osteoporosis, enfermedad de Paget y osteogénesis imperfecta.

La exposición de hueso necrótico maxilar o mandibular en pacientes tratados con bifosfonatos se está convirtiendo en un motivo de consulta cada vez más frecuente. Los bifosfonatos, son análogos no metabolizados del pirofosfato, con afinidad por el tejido óseo. Actúan sobre los osteoclastos (a través de un receptor de membrana o de una enzima intracelular) inhibiendo su quimiotaxis, acortando su vida media, frenando su actividad e induciendo su apoptosis. Como consecuencia, detienen la reabsorción ósea. El zolendronato y el pamidronato inhiben además la neoangiogénesis capilar tumoral.

La incidencia de complicaciones que se asocian es <1%. El riesgo estimado de osteonecrosis es de 0.01-0.04% y el tiempo de latencia hasta la aparición de los efectos adversos es mayor (3 años). El curso evolutivo de las lesiones es menos agresivo. Los bifosfonatos endovenosos (ácido zolendróico y pamidronato) son mucho más potentes. La incidencia de complicaciones es mucho más elevada (1-10%). El riesgo estimado de osteonecrosis es de 0.8 – 1%. Las lesiones aparecen antes de los 6 meses y son mucho más agresivas y complicadas de resolver.

Marx en 2003 publicó una serie de 36 casos de exposición ósea maxilar o mandibular por bifosfonatos. Desde entonces se han comunicado numerosos casos, y todavía cabe esperar muchos más dada la amplia difusión de estos fármacos entre la población.

La historia de la enfermedad, típicamente comienza con una alveolitis después de la extracción dental que progresa hacia una osteomielitis, con secuestros óseos, exposición ósea, inflamación y supuración. Con frecuencia se realizan biopsias para descartar metástasis óseas mandibulares o tumores maxilares óseos primarios. Al intentar cubrir esas áreas se fracasa, aunque se haya llevado a cabo una meticulosa regularización o resección ósea y cierre con colgajos mucosos locales. Clínica y radiológicamente las lesiones son similares a las lesiones de la osteoradionecrosis, con secuestros (formados espontáneamente o tras procedimientos invasivos) que pueden complicarse con infecciones secundarias.

Su patogenia radica en la interrupción de la actividad remodeladora osteoclástica y del recambio celular óseo, agravada por una insuficiencia vascular localizada como consecuencia de cambios isquémicos. Esta inhibición es parcial en el caso de bifosfonatos orales, produciéndose osteonecrosis raramente y sólo en casos de altas dosis acumuladas tras largos periodos de tiempo si se administran vía intravenosa, la inhibición osteoclástica es irreversible, produciéndose su apoptosis.

Esta entidad es característica del hueso maxilar o mandibular, estos fármacos tienen afinidad por él debido a su aporte vascular profuso y a su elevado *turnover* celular (hay

gran actividad de remodelación ósea alrededor del ligamento periodontal). Otros factores incluyen el escaso espesor de la mucosa maxilar-mandibular y la frecuente "agresión" a la que se ve sometido el hueso en forma de procedimientos quirúrgicos u odontológicos invasivos.

La osteonecrosis por bifosfonatos se puede afectar el maxilar superior en un 38- 80,5%, donde el 14-63% se localiza en mandíbula y el 5,5-23% en ambos.

El *S. gordonii* es un microorganismo de alta relacionada con la biopelícula en los bolsillos profundos de la encía y también se ha informado en diferentes enfermedades orales incluyendo BONJ (*Pushalkar et al., 2014*).

CATDEX

Las propiedades citotóxicas potentes de Catdex, la cual es una macro-molécula policationica, previamente se ha demostrado en cultivos de células tumorales. (*Márquez M. et al., 2002, Meuling L. et al., 2009*).

El Catdex también ha mostrado propiedades antimicrobianas en dos bacterias orales *S. mutans* UA130 y *P. gingivalis* W83 *in vitro* en concentraciones micromolares. En este estudio se compararon las propiedades antimicrobianas del Catdex utilizando como control la Clorhexidina probados en dos bacterias orales, *S. mutans* y *P. Gingivalis*. Obteniendo los siguientes resultados de que el Catdex inhibe el crecimiento de *S. mutans* y *P. gingivalis* y los cultivos mixtos en el mismo nivel que la Clorhexidina.

El Catdex tiene un efecto antimicrobiano inicial similar como la Clorhexidina, pero con un efecto más prolongado demostrado en el método de difusión en disco. El Catdex tiene potencial para uso como solución de antiséptico bucal. Estudios adicionales son necesarios. (*Escamilla E. et al., 2014*).

LÁSER

La acción antibacteriana del método de desinfección fotoactivada (PAD) se basa en la irradiación de la energía láser en longitudes de onda que se acercan del pico de

absorción de un fotosensibilizador que se irriga con anterioridad sobre las bacterias y es inocuo para los tejidos periodontales (*Dickers et al., 2009*). El uso del láser de 633 nanómetros y cloruro de tolonio se ha informado que es eficaz para matar las bacterias en tratamientos de endodoncia, como *Fusobacterium nucleatum*, *Peptostreptococcus*, *Prevotella intermedia* y *Streptococcus intermedius* en conductos de la raíz en humanos (*Williams et al., 2006*). De hecho, esta técnica se ha utilizado para la desinfección de pacientes con pulpitis o periodontitis perirradicular(*Bonsor et al., 2006*).

La terapia con láser de bajo nivel (LLLT) puede ser útil en la medicina regenerativa, ya que mejora la tasa de proliferación de diversas líneas celulares incluyendo células de mamíferos endoteliales en cultivo, utilizando longitudes de onda de láser 600 a 700 nm a densidades de energía en virtud de 4 J/cm² (*Alghamdi et al., 2012*). Por otra parte, se aceleró la cicatrización gingival de la herida se ha sugerido recientemente usando TLBI como la proliferación y la migración se ve reforzada en células de cultivo primario irradiados humanos gingivales epiteliales a través de una activación celular de la vía MAPK / ERK (*Ejiri, et al., 2013*).

La cicatrización ósea mejorada también se reportó el uso de la LLLT utilizando un láser de nm-633 con una 10 mW potencia para aumentar la proliferación y diferenciación de una línea celular de osteoblastos humanos (*Stein et al., 2005*). Los autores informaron aumento 31-58% en la supervivencia con respecto a las células no irradiadas y una doble cantidad de diferenciación positiva y la maduración de los osteoblastos humanos en vivo. Sin embargo, más tarde se sugirió que la radiación de un láser 830 nm a 10J/cm² era más adecuado para aumentar la proliferación de los osteoblastos (*Renno et al., 2007*). Más recientemente se demostró la diferenciación de osteoblastos después de la irradiación láser a pasar por la estimulación de la vía de señalización de proteína morfogenética ósea 2- Smad (*Hirata et al., 2010*).

Vescovi ha demostrado que el láser Nd: YAG bio-estimulación con láser se puede

utilizar para mejorar los resultados clínicos como la presencia de pus y cierre de colgajos mucosos antes y después del tratamiento en los pacientes afectados por BONJ (*Vescovi et al., 2007*), los autores informaron más tarde, un estudio sobre los pacientes que usan esta misma técnica y se encontró que más del 64% de los pacientes tenían signos mejor clínicos tales como menos dolor, síntomas de la infección, hueso expuesto o fístulas cuando se combina con el tratamiento médico y/o cirugía (*Vescovi et al., 2008*). Curiosamente, los láseres han sido también propuesto como un tratamiento quirúrgico alternativo en pacientes con Bonj osteonecrosis asociada del hueso alveolar. *Rugani, et al., en 2010* demostraron que se obtenía una cobertura más estable de la mucosa en pacientes tratados con láser. Un estudio reciente ha demostrado que se obtuvo la curación completa de la mucosa en el 80,4% de los pacientes que se sometieron a una combinación de la terapia con antibióticos, Er: YAG y la cirugía láser TLBI en pacientes con y sin cáncer (*Vescovi et al., 2012*).

El uso de láseres para la fotocoagulación de las lesiones en la odontología ha sido poco explorado. Una única exposición a la alta intensidad del láser de diodo se informó como un tratamiento eficaz para los labios y venosos oral., de las varices, que son lesiones vasculares con un aspecto clínico de color azul oscuro, en 32 pacientes (*Azevedo et al., 2013*). Además, se utilizó una técnica similar para grandes malformaciones venosas en la cavidad oral para la irradiación transmucosal que no producía formación de la úlcera profunda, sangrado o hinchazón grave después de la operación (*Miyazaki et al., 2013*). Asai reportó en el 2014 un estudio con 67 pacientes tratados con un láser de Nd: YAG a fotocoagular malformaciones vasculares en la cavidad oral. Los autores lesiones localizadas en el labio, lengua, mucosa bucal encía, suelo de la boca y el paladar blando tratados con éxito. Sin embargo, dos o más irradiaciones eran necesarias para tratar plenamente lesiones más profundas.

BIFOSFONATOS

Los bifosfonatos pertenecen al grupo de los pirofosfatos, los cuales funcionan uniéndose a los cristales de fosfato de calcio e inhiben su crecimiento, agregación y disolución. su

eficacia terapéutica se relaciona con su actividad anti-resortiva, por lo que son utilizados en enfermedades del hueso como hipercalcemia por cáncer, enfermedad metastásica ósea y la osteoporosis (*Hoskins et al., 1998; Eastell R. 1998; Hawkins et al., 2000*).

COMPOSICION QUIMICA

Existen dos tipos de bifosfonatos: los que contienen nitrógeno (alendronato, risendronato, pamidronato, zolendronato) y los que no contienen nitrógeno (etidronato, clodronato, tiludronato), se agrupan según la vía de administración que se emplee, ya sea oral o intravenosa.

Los bifosfonatos son compuestos sintéticos que tienen una estructura química similar al pirofosfato inorgánico, regulador endógeno del metabolismo óseo. La estructura general de los bifosfonatos es bastante fácil de modificar, por lo que las diferentes generaciones pueden variar mucho en sus características biológicas, terapéuticas y toxicológicas.

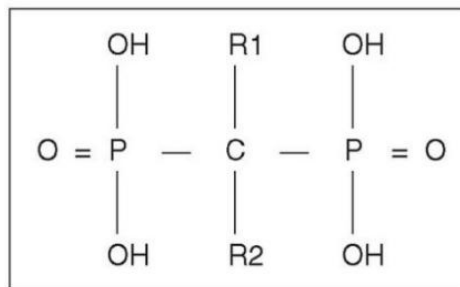


Figura 1.- Estructura de los bifosfonatos.

MECANISMO DE ACCION

Estos fármacos actúan suprimiendo y reduciendo la reabsorción ósea por los osteoclastos. Esto se consigue directamente impidiendo la agrupación y función de estos

osteoclastos, e indirectamente estimulando a los osteoblastos para producir inhibidores de la formación de los osteoclastos.

Debido a la supresión de la reabsorción ósea, se puede mejorar la sintomatología y las alteraciones óseas como la osteoporosis. La vida media de los bifosfonatos en el torrente sanguíneo es muy corta, oscila entre los 30 minutos y las 2 horas, pero una vez absorbidos por la estructura ósea, pueden persistir durante más de 10 años.

Los factores de riesgo que se relacionan con las osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos según la Sociedad Española de Cirugía Bucal (SECIB) son: pacientes con mieloma múltiple, pacientes con tratamiento concomitante con corticoesteroides, pacientes con ingesta de bifosfonatos orales por más de 3 años, con un tiempo de consumo de 5-6 años (*García Chacón et al., 2010 Carranza et al., 2000; Ghoneima et al., 2010*).

Los bifosfonatos son caracterizados por una baja absorción intestinal (1-5%), pero con una alta captación y retención a nivel óseo. Se estima que aproximadamente el 80% es eliminado por el riñón y el 20% es captado por el hueso.

Su vida media plasmática es de solo una hora, pero su permanencia, una vez captado por el hueso es de años. Son fármacos que inhiben la resorción ósea y que contiene dos grupos fosfonados unidos a un átomo de carbono, en una estructura “P-C-P”, en lugar de un átomo de oxígeno como ocurre en los pirofosfatos (*Fleisch et al., 1998*).

Los bifosfonatos son potentes inhibidores de la resorción ósea mediada por osteoclastos, reduciendo su actividad y acelerando su apoptosis (*Winter et al., 2012*).

Cuando los osteoclastos acidifican la interface ósea al comienzo de la resorción, el alendronato se libera inactivándolos. Así mismo, se ha demostrado en diversos estudios una disminución en la formación de los osteoclastos y de su ciclo de vida (*Hardam et al., 2013; Kaare et al., 1964*).

El tratamiento ideal con bifosfonatos ha probado que reduce la posibilidad de fractura entre 6-12 meses, después de haber iniciado la terapia, se ha demostrado que el efecto

anti-fractura en pruebas con placebo que con un periodo de 3-4 años de duración del tratamiento, continua siendo efectivo.

EFFECTOS SECUNDARIOS

En general los bifosfonatos son fármacos bien tolerados cuando se administran correctamente. Los efectos secundarios relacionados con el aparato digestivo superior son los más frecuentes. Pueden incrementar ligeramente la frecuencia de erosiones y úlceras gástricas y se han descrito también algunos casos de esofagitis y estenosis esofágicas. Raramente se han descrito efectos adversos oculares como la conjuntivitis, escleritis o uveítis.

La administración continuada de etidronato puede inhibir la mineralización y causar osteomalacia focal, de ahí que se administre de manera intermitente. Los bisfosfonatos más modernos carecen de este efecto.

Se han asociado los bifosfonatos con el osteonecrosis de la mandíbula. El 60% de los casos ocurrieron después de cirugía dental o remodelación ósea, en la actualidad se recomienda posponer el tratamiento con el bifosfonato durante al menos 3 meses para posteriormente realizar la intervención bucal.

Este último efecto secundario desfavorable es mucho más frecuente al usar los bifosfonatos por vía intravenosa, generalmente en Oncología, siendo su efecto acumulativo. Al quedar el hueso impregnado durante largos años, es discutible el efecto preventivo de la supresión de los mismos

MATERIALES Y METODOS

MATERIALES Y METODOS

Universo de estudio

En el estudio se utilizaron 36 ratas Wistar de 8 semanas de edad que se obtuvieron en la Unidad de Modelos Biológicos del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo león, ya que estas tienen un desarrollo similar al cuerpo humano y se han usado anteriormente en numerosos estudios de tipo farmacológico, toxicológico y crecimiento y desarrollo craneofacial.

Tamaño de la Muestra

En el tamaño de muestra total., fue de 36 ratas Wistar que se obtuvieron de la Unidad de Modelos Biológicos del Centro de Investigación y Desarrollo en Ciencias de la Salud (CIDICS) de la Universidad Autónoma de Nuevo León.

Forma de asignación de los casos a los grupos de estudio:

-Aleatoria

Características de los grupos experimentales y grupos control:

GRUPO CON TRATAMIENTO CON CLINDAMICINA

Grupo de 6 ratas Wistar a las cuales se les administró medicamento IV (bifosfonato) durante 6 semanas, se realizó la inoculación con *S. gordonii* previa osteotomía mandibular, para provocar una osteonecrosis mandibular, posteriormente se aplicó como tratamiento: Clindamicina intramuscular, y se evaluarán las características clínicas y óseas mediante la densidad ósea en unidades Hounsfield de la Imagenología 3D (Cone Beam)

GRUPO CON TRATAMIENTO CON LASER FOTOTERMICO

Grupo de 6 ratas Wistar a las cuales se les administró medicamento IV (bifosfonato) durante 6 semanas, se realizó la inoculación con *S. gordonii* previa osteotomía mandibular, para provocar una osteonecrosis mandibular, posteriormente se aplicó como tratamiento: laser fototérmico en la región afectada, y se evaluaron las características clínicas y óseas mediante la densidad ósea en unidades Hounsfield en la Imagenología 3D (Cone Beam).

GRUPO CON TRATAMIENTO CON TERMOCOAGULACION

Grupo de 6 ratas Wistar a las cuales se les administró medicamento IV (bifosfonato) durante 6 semanas, se realizó la inoculación con *S. gordonii* previa osteotomía mandibular, para provocar una osteonecrosis mandibular, posteriormente se aplicó como tratamiento: termocoagulación, y se evaluaron las características clínicas y óseas mediante la densidad ósea en unidades Hounsfield en la Imagenología 3D (Cone Beam).

GRUPO CON TRATAMIENTO CON CATDEX

Grupo de 6 ratas Wistar a las cuales se les administró medicamento IV (bifosfonato) durante 6 semanas, se realizó la inoculación con *S. gordonii* previa osteotomía mandibular, para provocar una osteonecrosis mandibular, posteriormente se aplicó como tratamiento: Catdex de manera local y se evaluaron las características clínicas y óseas mediante la densidad ósea en unidades Hounsfield en la Imagenología 3D (Cone Beam).

GRUPO CONTROL NEGATIVO:

Grupo de 6 ratas Wistar a las cuales no se les administro medicamento IV (bifosfonato) durante todo el estudio, no se realizó la inoculación con *S. gordonii* ni osteotomía

mandibular y se evaluarán las características clínicas y óseas mediante la densidad ósea en unidades Hounsfield en la Imagenología 3D (Cone Beam).

GRUPO CONTROL POSITIVO:

Grupo de 6 ratas Wistar a las cuales se les administró medicamento IV (bifosfonato) durante 6 semanas, se realizó la inoculación con *S. gordonii* previa osteotomía mandibular, no se aplicó ningún tratamiento, posteriormente se evaluaron las características clínicas y óseas mediante la densidad ósea en unidades Hounsfield en la Imagenología 3D (Cone Beam)

Efecto de las variables y resultados:

- Densidad de especies bacterianas (antes y después de la osteotomía mandibular).
- La tasa de éxito de la osteotomía mandibular.
- Tasa de éxito de la osteonecrosis en el grupo de control.
- Tasa de extensión de la osteonecrosis en el grupo de control.
- Medida de la densidad ósea de cada grupo.
- Las manifestaciones clínicas de BONJ (hueso expuesto, sin cicatrizar la mucosa, pérdida de peso, inflamación y pus).
- Recuento de leucocitos en muestras de sangre (evidencia de infección).

Métodos para la toma de medidas

- Imagenología en 3D (Cone Beam) / Fotografía

MODELO ANIMAL GENERAL

- **Modelo:**

- Modelo de rata Osteonecrosis inducida por Bifosfonatos

- 36 Ratas Wistar machos, 8 semanas de edad

- 2 semanas para la aclimatación

- **Anestesia:**

- Intraperitoneal., para sedación con pentobarbital.,

- **Protocolo de tratamiento:**

- Semanas 1-6:** la administración de los bifosfonatos intravenosa por la vena caudal., de la Rata Wistar, una vez por semana (1 mg/kg)

- Semana 5:** Toma de muestra bacteriana antes y después de la inoculación. En primer lugar, la inoculación bacteriana se realiza antes de la simulación de la extracción del diente mediante una osteotomía mandibular, posteriormente se procede a la inoculación de bacterias diario durante una semana.

- Semana 6:**Administración del tratamiento por grupo Clindamicina, Fotocoagulación, laser Fototérmico, Catdex. (ver diagrama)

- Semana 7:** La eutanasia y el tejido obtenido para su análisis de datos mediante imagenología 3D (Cone Beam).

- **Post-operatorio manejo del dolor:** Antiinflamatorio no Esteroideo

- **Las técnicas quirúrgicas:** osteotomía mandibular intraoral

- **Criterios para la eliminación de estudio:** rata pierde 20% de su peso,

- **La eutanasia:** sobredosis de anestesia.



Figura 2.- Diagrama del protocolo de osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos en ratas Wistar

Criterios de Selección:

a) Criterios de inclusión

- Ratas de la misma raza y edad
- Ratas sanas sin presencia de antecedentes patológicos

b) Criterios de exclusión

- Ratas que presenten alguna patología.
- Ratas con presencia de infecciones previas.
- Ratas con edad o raza diferente a la indicada.
- Ratas que nazcan con algún defecto congénito.

c) Criterios de eliminación

1. Ratas que presenten desnutrición o peso inadecuado.

DESCRIPCION DEL PROCEDIMIENTO

En éste estudio se tomó como población un grupo de 36 ratas Wistar, a quienes se les realizo el siguiente procedimiento:

1.- Se alimentaron y cuidaron a las ratas hasta que alcanzaran un peso ideal de 250 a 300mg y que tuvieran 8 semanas de edad.

Todos los días se les dio 20 gr de alimento, agua y se les aseaba el área en donde se encontraban con la finalidad de que se aclimataran.

2.-Se separaron en 6 grupos de 6 ratas cada unoaleatoriamente:

- Grupo control positivo
- Grupo control negativo
- Grupo tratado con Clindamicina
- Grupo tratado con Fototermia
- Grupo tratado con Fotocoagulación Laser
- Grupo tratado con Catdex

3.- Se separaron y colocaron en jaulas colectivas para ratas, identificándolas con colores y números para poder diferenciar de forma adecuada a cada uno de los grupos.

4.- Se administró el bifosfonato (Ácido Zolendróico) por vía intravenosa en una dosis de 1 mg/kg por la vena caudal de la rata Wistar a los grupos experimentales una vez por semana durante 6 semanas, con la ayuda de un médico Veterinario Zootecnista y con un adecuado manejo de animales, y las condiciones adecuadas.

5.- A la quinta semana, primero se tomó un cultivo bacteriano intraoral y posteriormente se inocularon a cada uno de los grupos experimentales *S. gordonii* intraoralmente mediante una pipeta colocando 100 ug de *S. gordonii* (24 horas previas a la realización de la osteotomía mandibular).

6.- Se administró anestesia general a cada una de las ratas para la realización de la osteotomía mandibular a nivel del primer molar inferior izquierdo con ayuda de un médico veterinario zootecnista

Para trabajar con los animales *in vivo* es necesario el uso de anestésicos para sedarlos y poder realizar la osteotomía mandibular.

Los anestésicos que comúnmente se utilizan en veterinaria son:

Derivados de los opiáceos: producen poca relajación muscular. Por ejemplo: fentanilo, sulfentanilo, bupremorfina).

Benzodiacepinas: son fármacos que si producen relajación muscular. Por ejemplo: Diazepan, Midazolam.

Ketamina: produce poca relajación muscular y tiene un efecto analgésico.

Atropina: es una inhibidora competitiva de la acetilcolina (neurotransmisor). Este fármaco no es anestésico, pero tiene propiedades inhibitorias de la salivación y la secreción bronquial que producen algunos anestésicos, protegiendo así mismo al corazón de la inhibición vagal que producen otros anestésicos y que desembocaría en una bradicardia (disminución del ritmo de los latidos del corazón).

Pentobarbital: las dosis suministradas son de entre 20-60 mg/kg de peso, pero pueden producir una depresión respiratoria en el animal así que debe administrarse con mucho cuidado.

Este medicamento fue elegido para la realización de este estudio debido a su rápida acción y duración media para nuestra muestra.

Uretano: es un anestésico estable durante periodos muy largos de tiempo. Disminuye la posibilidad de que haya una depresión respiratoria y del sistema cardiovascular, pero desgraciadamente es carcinógena y el animal debe ser sacrificado después de su uso, también produce daños irreversibles en el cerebro.

Anestésicos inhalatorios: para administrarlos es necesaria una cámara anestésica, en la que se mantiene el animal mediante una concentración modulable de anestesia mediante una mascarilla. Los anestésicos más usados con este método son los metileterhalogenados, como el halotano, isoflurano o el enflurano.

Vías de Administración:

Describiremos a continuación las vías de administración más comunes para la utilización de fármacos anestésicos en roedores:

- **Intravenosa:** se inyecta el fármaco en la vena caudal., del roedor. Es necesario provocar una vasodilatación, por lo que se moja la cola en etanol o bien, se sumerge la aguja con la que se administra el fármaco en agua a 40°C.
- **Intraperitoneal:** se mantiene la cabeza del animal hacia abajo. Se usa una aguja calibre corto y la punción, se hace en la parte caudal izquierda del abdomen.
- **Intramuscular:** se coloca el fármaco en el bíceps femoral o en el glúteo. La aguja debe ser de poco calibre y para corroborar de que el fármaco se haya infiltrado correctamente, se suele aspirar una pequeña cantidad después de la inyección.
- **Subcutánea:** se retrae un poco la piel de la parte posterior del cuello del roedor y se coloca en esa zona el fármaco, suele formar edema que va a ir desapareciendo conforme el cuerpo absorba el fármaco.
- **Intragástrica:** muy usada cuando se administran suspensiones sedantes.

7.- Después de colocar la anestesia intraperitoneal con pentobarbital se procedió a colocar un abre bocas en el roedor, posteriormente realizamos una osteotomía con ayuda de una fresa redonda número 6 y un micromotor quirúrgico en la región de primer molar inferior izquierdo simulando una extracción dental.

- 8.- Se inoculó *S. gordonii* de manera directa en la región afectada en una cantidad de 100 ug por roedor con ayuda de una micropipeta. Dicha bacteria se continuó inoculando mediante la colocación de *S. gordonii* en el alimento del roedor durante una semana.
- 9.- Se administró el tratamiento seleccionado para cada grupo experimental., (Catdex, Fotocoagulación con láser, Láser Fototérmico, Clindamicina)
- 10.- Posterior a la séptima semana, se realizó la eutanasia mediante la administración de pentobarbital a dosis altas.
- 11.- Se tomó la Imagenología en 3D (Cone Beam) para observar sus cortes axiales, sagitales y coronales de cada rata Wistar y poder comparar la densidad ósea de la región mandibular izquierda (afectada) con la región mandibular derecha (no afectada).
- 12.- Se obtuvieron los resultados y se compararon los datos por cada grupo experimental.

A nivel laboratorio:

Las 36 ratas se dividirán en 6 grupos experimental.,es:

- El primer grupo constara de 6 ratas Wistar, se administró bifosfonato intravenoso y se utilizó Catdex como tratamiento.
- El segundo grupo constara de 6 ratas Wistar, se administró bifosfonato intravenoso y se utilizó Fototermia láser como tratamiento.
- El tercer grupo constara de 6 ratas Wistar, se administró bifosfonato intravenoso y se utilizó Termocoagulación como tratamiento.
- El cuarto grupo constara de 6 ratas Wistar, se administró bifosfonato intravenoso y se utilizó Clindamicina como tratamiento.
- El quinto grupo constará de 6 ratas Wistar, a las cuales se le administró bifosfonato intravenoso sin recibir farmacoterapia (grupo control positivo)
- El sexto grupo constara de 6 ratas Wistar, a las cuales no se le realizó ningún tratamiento (grupo control negativo).

Las dosis de cada medicamento administrado a cada rata, fue obtenida dependiendo del peso de cada una de ellas y la cantidad en volumen del medicamento. Así como también se calculó la dosis adecuada del anestésico y/o relajante muscular.

TECNICA DE APLICACIÓN DEL BIFOSFONATO INTRAVENOSO

- Con la ayuda del Veterinario encargado del cuidado de las ratas, se sostenía a cada una de ellas de manera individual y se colocaba en una caja de acrílico especial para ratas para que permanecieran inmóviles y que la cola estuviera expuesta para una adecuada identificación de la vena caudal.
- Se realizó la tricotomía de la cola de la rata para una adecuada visualización de la vena caudal.
- Se colocó alcohol con ayuda de una torunda de algodón en el sitio de la punción, para que el operador inyectara el Ácido Zolendrónico en una dosis de 1 mg/kg de peso con ayuda de una jeringa de 1 ml.
Prevía infiltración se tenía que aspirar para corroborar el sitio de punción adecuado.
- La infiltración del bifosfonato (Ácido Zolendrónico) se realizó una vez por semana durante 6 semanas.

TECNICA PARA LA ANESTESIA GENERAL Y OSTEOTOMIA MANDIBULAR

- Se aplicó una dosis de Xilacina (Relajante Muscular) a cada una de las ratas para facilitar la manipulación de estas.
- Se colocó la anestesia intraperitoneal con fenobarbital (25-40 mg/kg peso)
- Esperamos a que hiciera efecto el anestésico colocado.
- Se colocó un abre bocas en el roedor, posteriormente se realizó una osteotomía con ayuda de una fresa redonda número 6 y un micromotor quirúrgico en la región de primer molar inferior izquierdo simulando una extracción dental.
- Se inoculó *S. gordonii* de manera directa con ayuda de una micropipeta en el lugar de la osteotomía mandibular (100ug)
-

Taxon	Barbitúrico (Pentobarbital sódico)	Thopental (pentotal)	Ketamina	Uretano	Exobarbital	Thiamynal
Rata	25 * IV 40-50 * IP	20 * IV 40 * IP	22-44 * IM	0.75 * IP	200 * IP	40-70 * IV SOL AL 1 %
Ratón	35 * IV 40- 50 * IP	25 * IV 50 * IP	22-44 * IM		200 * IP	
Hamster	35-40 *IP	20 * IV 40 * IP	22-44 * IM			
Cobayo	30 * IV 40 * IP	20 * IV 40-50 * IP	22-44 * IM	1.5* IP	200 * IP	
Conejo	30 * IV 30 * IP	20 * IV	22-44 * IM	1.0 * IV 1.0 * IP	40 * IV	45-60 * IV SOL AL 2 %
IV = intravenosa IP= intraperitoneal IM = intramuscular 25* = mg/kg de peso vivo						

Tabla1.- Anestésicos recomendados para animales con fines de experimentación y enseñanza dependiendo del taxón/especie (Olivares, 1996)

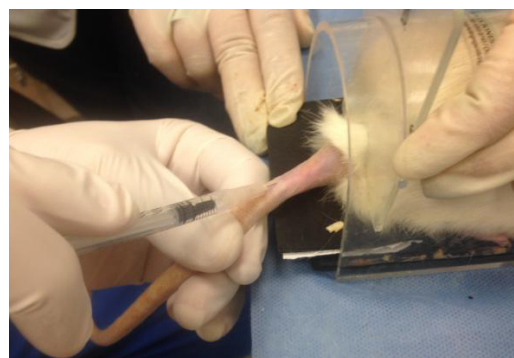
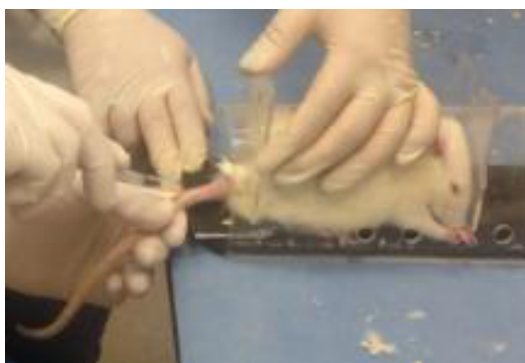


Figura 4 y 5.- Infiltración del Ácido Zolendrónico por la vena caudal de la rata Wistar a una dosis de 1 mg/ kg de peso.



Figura 6 y 7.- Infiltración de Pentobarbital sódico en la región intraperitoneal de la Rata Wistar a una dosis del 25-40 mg/kg peso.



Figura 8.- Toma de cultivo intraoral en región retromolar de la rata Wistar previo a la osteotomía Mandibular.

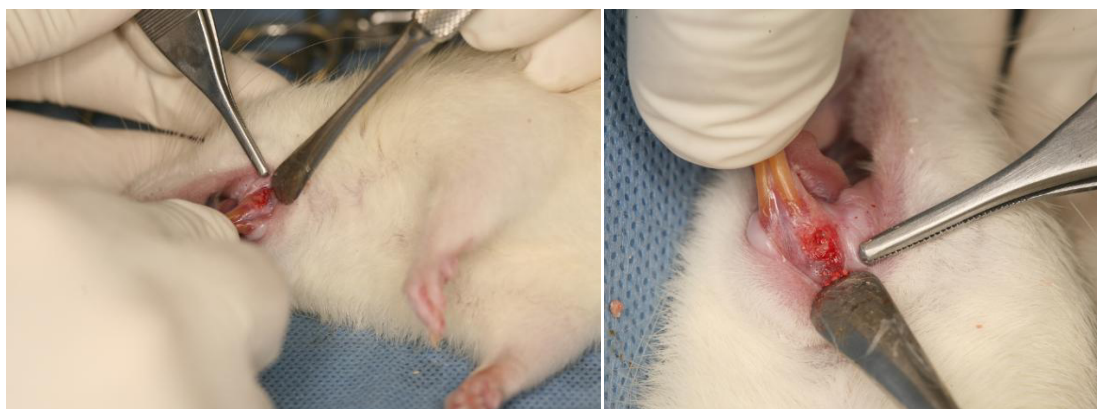


Figura 9 y 10.- Zona de la osteotomía mandibular izquierda con una fresa redonda de carburo número 6.



Figura 11 y 12.- Láser Fox, A.R.C. de la empresa de Kevort Instruments para la realización de la Fototermia láser y fotocoagulación.

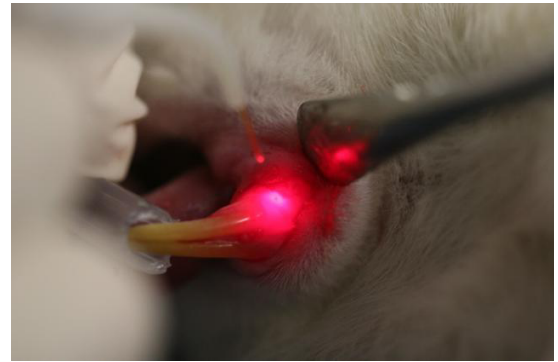


Figura 13 y 14.- Colocación de la fotocoagulación láser en la región de la osteotomía mandibular izquierda

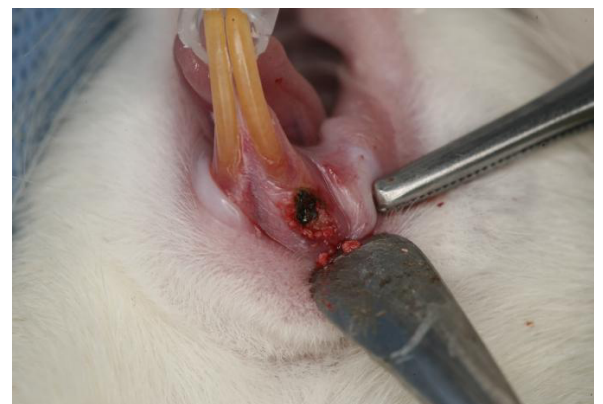


Figura 15 y 16.-Zona de la osteotomía mandibular izquierda antes y después de la colocación de la fotocoagulación láser.

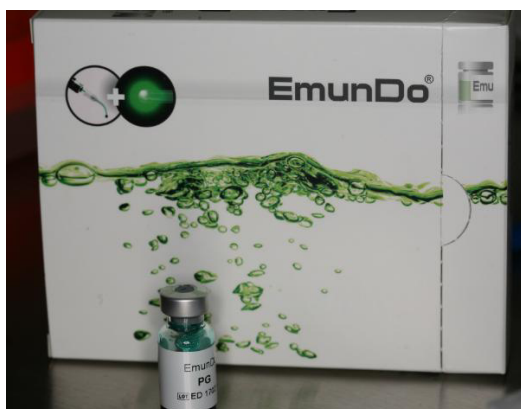


Figura 17 y 18.- Colocación del material., EmunDo en la zona de la osteotomía mandibular izquierda para el grupo experimental., de ratas Wistar cuyo tratamiento es el de Fototermia láser.



Figura 19 y 20.- Activación del material., EmunDo en la zona de la osteotomía mediante láser Fototérmico, formando una capa protectora en la zona afectada.

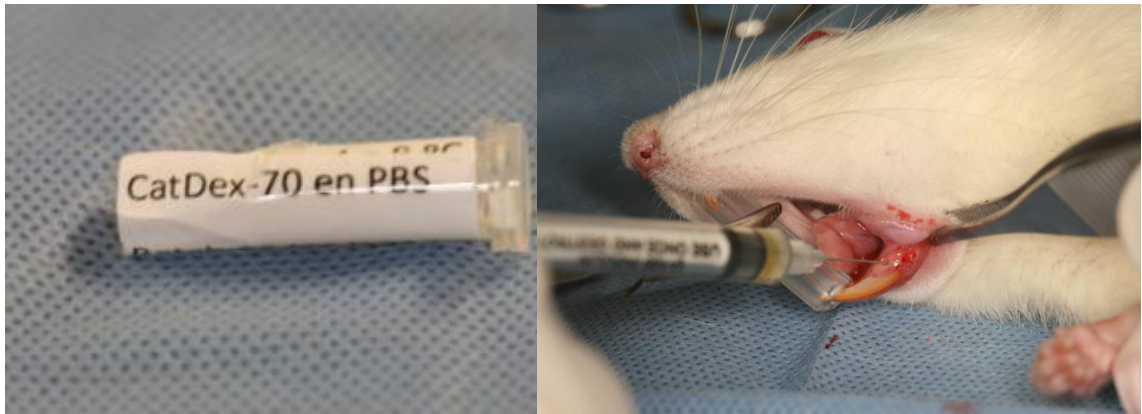


Figura 21 Y 22.- Colocación de la poliguanidina conjugada (Catdex) de manera directa en el lugar de la osteotomía mandibular.

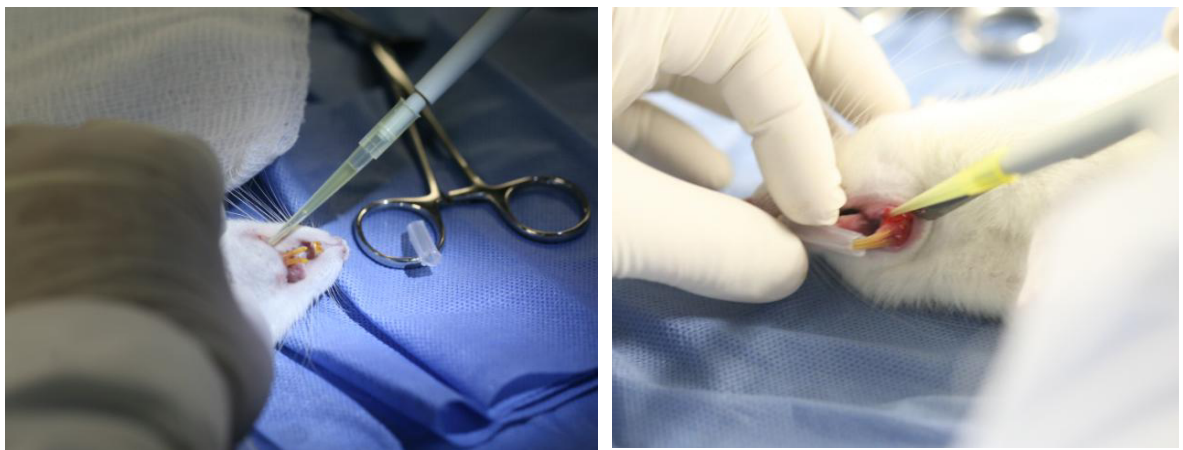


Figura 23 y 24.-Inoculación directa de *S. gordonii* en la zona de la osteotomía mandibular izquierda mediante la utilización de una micropipeta.



Figura 25.- Toma de cultivo bacteriano intraoral una semana posterior a la inoculación / osteotomía mandibular.



Figura 26.- Retraso en la cicatrización a las 3 semanas de realizada la osteotomía mandibular izquierda.

RESULTADOS

En nuestro modelo de investigación animal (rata Wistar) se observó clínicamente que la administración de Ácido Zolendróico por vía intravenosa durante cuatro semanas y 3 semanas después de la osteotomía en la región mandibular del lado izquierdo, hubo alteraciones clínicas como el retraso en la cicatrización con ligera exposición de tejido óseo con inflamación y ligera epitelización en la periferia de la osteotomía (observar figura 26). Situación compatible con Osteonecrosis mandibular por bifosfonatos similar a la que se produce en humanos según la Asociación Americana de Cirugía Oral y Maxilofacial.

Con las dosis y tiempos empleados en nuestro estudio hubo cambios en la densidad ósea del lado izquierdo (lado afectado) en comparación con el lado derecho (lado no afectado) como consecuencia de la administración por vía intravenosa del bifosfonato (Ácido Zolendróico), ya que según la literatura, la administración por vía intravenosa tiene mayor incidencia de presentar Osteonecrosis mandibular y alteraciones sistémicas, comprobamos los cambios en la densidad ósea mediante las unidades Hounsfield de la imagenología en 3D (Cone Beam) . Cabe mencionar que diversos estudios realizados anteriormente en ratas, el bifosfonato fue administrado por vía subcutánea, por lo tanto, no se reportaron alteraciones radiológicas ni histopatológicas (*Moñivas et al., 2015*).

**TABLA COMPARATIVA DE LA DENSIDAD OSEA MEDIDA MEDIANTE UNIDADES
HOUNSFIELD EN IMAGENOLOGIA 3D (CONE BEAM)**

GRUPO	No. RATA	NUMERO	DENSIDAD OSEA IZQ	DENSIDAD OSEA DER	U DIFERENCIAL
CONTROL NEGATIVO	1	31	1036	1041	5
	2	32	996	1334	338
	3	33	969	1188	219
	4	34	361	1128	7
	5	NA	NA	NA	NA
	6	36	1254	1126	-128
CONTROL POSITIVO	1	25	1045	1059	14
	2	26	1094	1126	32
	3	27	1090	1263	173
	4	28	224	1107	883
	5	29	1298	987	311
	6	35	1308	1329	21
ANTIBIOTICO	1	19	163	1370	1207
	2	20	1202	1212	10
	3	21	1152	628	524
	4	22	262	1116	864
	5	23	693	665	28
	6	NA	NA	NA	NA
FOTOCOAGULACION	1	9	1082	1132	50
	2	12	1192	1358	166
	3	NA	NA	NA	NA
	4	NA	NA	NA	NA
	5	NA	NA	NA	NA
	6	NA	NA	NA	NA
FOTOTERMIA	1	14	1155	1092	-63
	2	NA	NA	NA	NA
	3	16	955	621	-334
	4	17	819	940	-121
	5	NA	NA	NA	NA
	6	NA	NA	NA	NA
CAT DEX	1	1	344	1043	699
	2	2	1285	1289	4
	3	3	276	1194	918
	4	4	353	801	448
	5	5	943	1059	116

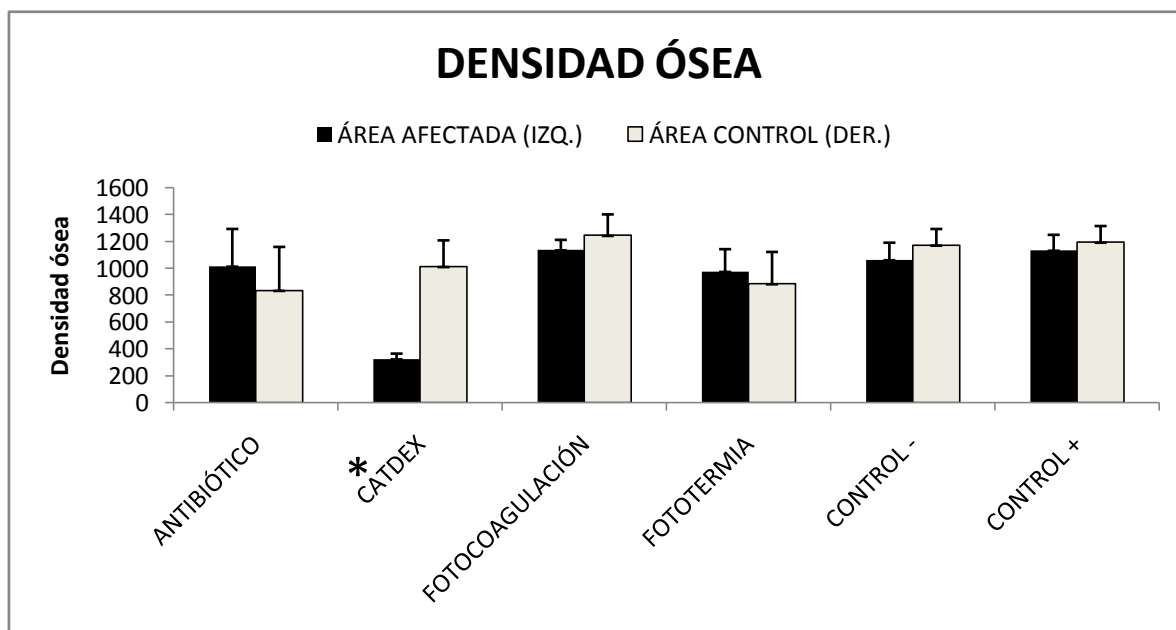
NA (no aplica) la explicación es que se perdieron algunas ratas porque murieron no soportaron la anestesia general.

RESULTADOS ESTADISTICOS

PROMEDIO	DENSIDAD ÓSEA	
	ÁREA AFECTADA	ÁREA CONTROL
	(IZQ.)	(DER.)
ANTIBIÓTICO	1016	835
CATDEX	324	1013
FOTOCOAGULACIÓN	1137	1245
FOTOTERMIA	976	884
CONTROL -	1064	1172
CONTROL +	1134	1194

DESV. ESTÁNDAR	DENSIDAD ÓSEA	
	ÁREA AFECTADA	ÁREA CONTROL
	(IZQ.)	(DER.)
ANTIBIÓTICO	281	327
CATDEX	42	198
FOTOCOAGULACIÓN	78	160
FOTOTERMIA	169	240
CONTROL -	130	124
CONTROL +	118	124

Tabla: comparación del promedio de la densidad ósea del lado afectado (lado izquierdo) y el lado no afectado (lado derecho) que se obtuvo en cada uno de los grupos experimentales, así como su desviación estándar.

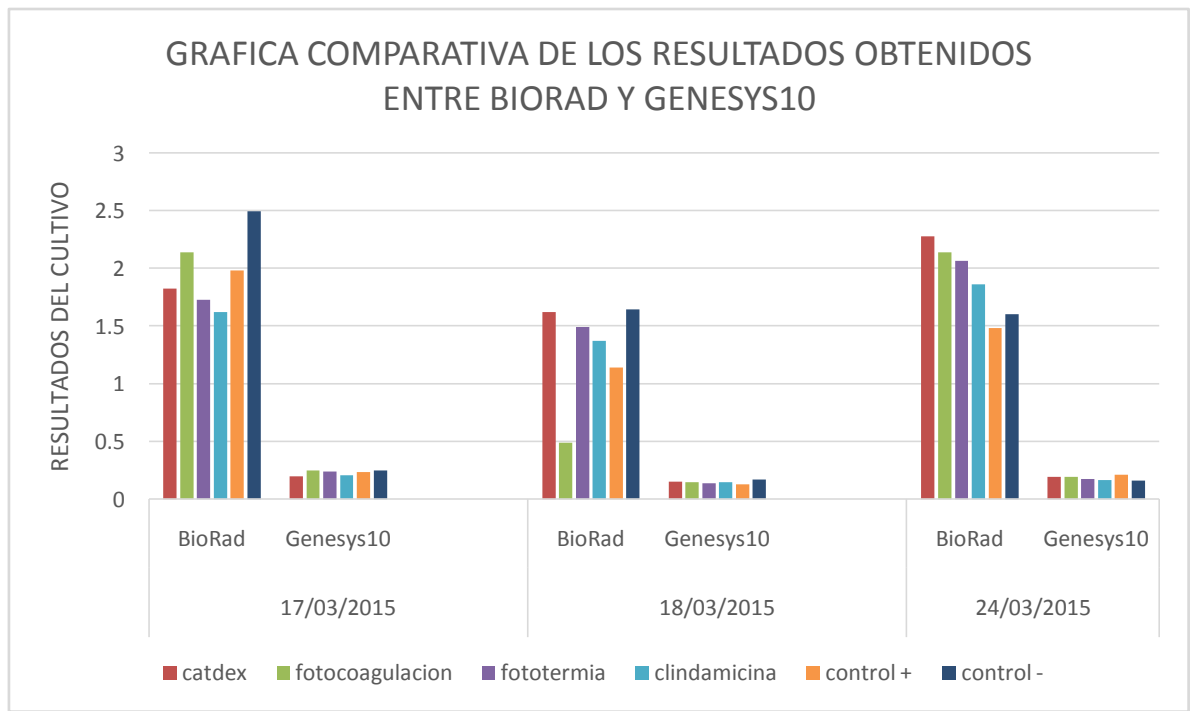


Grafica: muestra la comparación del promedio de la densidad ósea del lado afectado (lado izquierdo) y el lado no afectado (lado derecho) en cada uno de los grupos experimentales (antibiótico, catdex, fotocoagulación, fototermia)

RESULTADOS ESTADISTICOS DEL CULTIVO BACTERIANO

	17/03/2015		18/03/2015		24/03/2015	
TRATAMIENTO	BioRad	Genesys10	BioRad	Genesys10	BioRad	Genesys10
<i>Catdex</i>	1.826333333	0.199333333	1.62383333	0.151	2.278666667	0.192666667
<i>Fotocoagulacion</i>	2.1405	0.251333333	0.4915	0.149	2.1405	0.193
<i>Fototermia</i>	1.727666667	0.239166667	1.492	0.1408	2.0644	0.1734
<i>Clindamicina</i>	1.620833333	0.206	1.3724	0.1502	1.8636	0.1648
<i>Control +</i>	1.982333333	0.237833333	1.14066667	0.130333333	1.48283333	0.210333333
<i>Control -</i>	2.4955	0.248166667	1.64766667	0.172	1.6024	0.16

Tabla: Cantidad de bacterias se midieron que se obtuvieron en el cultivo intraoral de las ratas antes de la inoculación (17/03/15), antes de las 24 horas se realizó la ostotomia despues se hizo un tratamiento, y se incoculó bacterias directamente con una micropipeta y se volvio a medir la cantidad de las bacterias a las 24 horas despues (18/03/15), y se continua con la administración de las bacterias dentro del alimento. A los 7 días se midieron la cantiad de bacterias después de la inoculación de *S. gordonii* (24/03/15), los resultados se obtuvieron mediante los métodos BioRad y Genesys10.

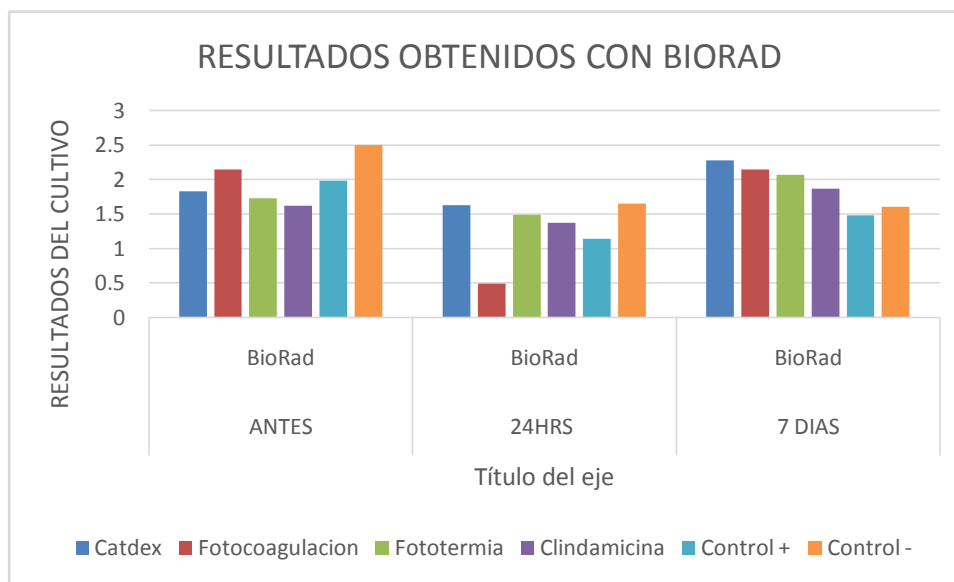


Grafica comparativa de los resultados que se obtuvieron mediante BioRad y Genesys10 antes, durante y 7 días después de la inoculación.

Se baja la cantidad de bacterias después de 24 hrs incluso en los controles porque se pierde material bacteriano del alveolo después de la extracción de los dientes. Los incrementos encontrados después de 7 días son positivos ya que las ratas se sentían mejor para comer más alimento posiblemente. Recordando que el control negativo nunca se le administra bacteria ni inoculada ni en alimento. El resultado que nos interesa es el de 24 horas y no el de 7 días después. El resultado de 7 días muestra más el estado físico de las ratas.

	ANTES	24HRS	7 DIAS
TRATAMIENTO	BioRad	BioRad	BioRad
<i>Catdex</i>	1.826333333	1.62383333	2.27866667
<i>Fotocoagulacion</i>	2.1405	0.4915	2.1405
<i>Fototermia</i>	1.727666667	1.492	2.0644
<i>Clindamicina</i>	1.620833333	1.3724	1.8636
<i>Control +</i>	1.982333333	1.14066667	1.48283333
<i>Control -</i>	2.4955	1.64766667	1.6024

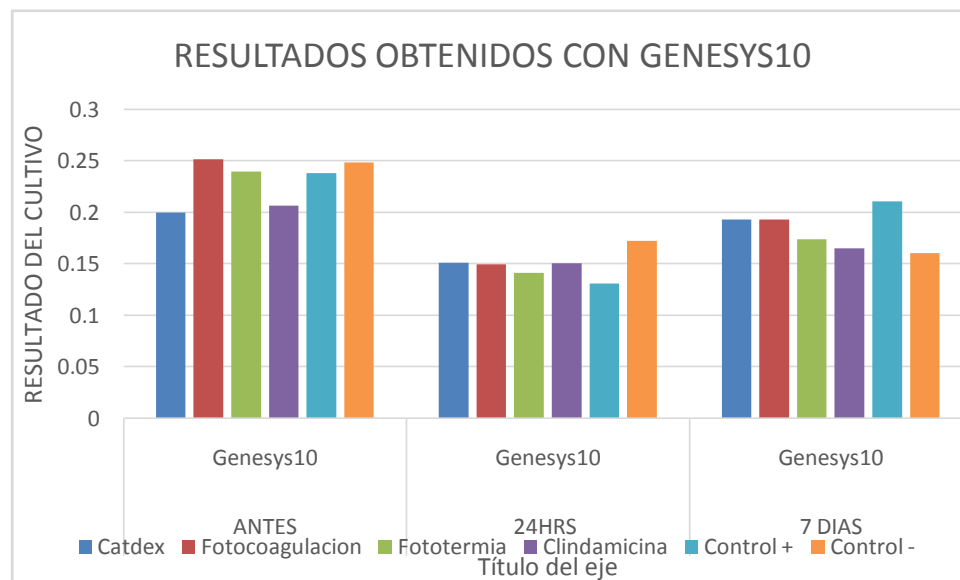
Tabla: Resultados obtenidos con BIORAD de la cantidad de bacterias encontradas en el cultivo intraoral de las ratas antes de la inoculación bacteriana, 24 horas después de la inoculación y 7 días después de la inoculación de *S. gordonii*.



Grafica comparativa de los resultados obtenidos con BIORAD de la cantidad de bacterias encontradas en el cultivo intraoral de las ratas antes de la inoculación bacteriana, 24 horas después de la inoculación y 7 días después de la inoculación de *S. gordonii*.

	ANTES	24HRS	7 DIAS
TRATAMIENTO	Genesys10	Genesys10	Genesys10
<i>Catdex</i>	0.199333333	0.151	0.192666667
<i>Fotocoagulacion</i>	0.251333333	0.149	0.193
<i>Fototermia</i>	0.239166667	0.1408	0.1734
<i>Clindamicina</i>	0.206	0.1502	0.1648
<i>Control +</i>	0.237833333	0.130333333	0.210333333
<i>Control -</i>	0.248166667	0.172	0.16

Tabla: Resultados obtenidos con GENESYS10 de la cantidad de bacterias encontradas en el cultivo intraoral de las ratas antes de la inoculación bacteriana, 24 horas después de la inoculación y 7 días después de la inoculación de *S. gordonii*.



Grafica comparativa de los resultados obtenidos con GENESYS10 de la cantidad de bacterias encontradas en el cultivo intraoral de las ratas antes de la inoculación bacteriana, 24 horas después de la inoculación y 7 días después de la inoculación de *S. gordonii*.

FECHA	Control -	Control +	Δ
Antes	2.4955	1.982333333	0.51316667
24 hr	1.647666667	1.140666667	0.507
7dias	1.6024	1.482833333	0.11956667
FECHA	Control -	Catdex	Δ
Antes	2.4955	1.826333333	0.66916667
24 hr	1.647666667	1.623833333	0.02383333
7dias	1.6024	2.278666667	-0.67626667
FECHA	Control -	Fotocoagulacion	Δ
Antes	2.4955	2.1405	0.355
24 hr	1.647666667	0.4915	1.15616667
7dias	1.6024	2.1405	-0.5381
FECHA	Control -	Fototermia	Δ
Antes	2.4955	1.727666667	0.76783333
24 hr	1.647666667	1.492	0.15566667
7dias	1.6024	2.0644	-0.462
FECHA	Control -	Clindamicina	Δ
Antes	2.4955	1.620833333	0.87466667
24 hr	1.647666667	1.3724	0.27526667
7dias	1.6024	1.8636	-0.2612

Tabla comparativa del grupo control negativo con los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, Catdex, fotocoagulación, Fototermia) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*, 24 horas después de la inoculación y una semana después de la inoculación.

FECHA	Control +	Control -	Δ
Antes	1.98233333	2.4955	-0.51316667
24 hr	1.14066667	1.64766667	-0.507
7dias	1.48283333	1.6024	-0.11956667
FECHA	Control +	Catdex	Δ
Antes	1.98233333	1.826333333	0.156
24 hr	1.14066667	1.623833333	-0.48316667
7dias	1.48283333	2.27866667	-0.79583333
FECHA	Control +	Fotocoagulación	Δ
Antes	1.98233333	2.1405	-0.15816667
24 hr	1.14066667	0.4915	0.64916667
7dias	1.48283333	2.1405	-0.65766667
FECHA	Control +	Fototermia	Δ
Antes	1.98233333	1.72766667	0.25466667
24 hr	1.14066667	1.492	-0.35133333
7dias	1.48283333	2.0644	-0.58156667
FECHA	Control +	Clindamicina	Δ
Antes	1.98233333	1.620833333	0.3615
24 hr	1.14066667	1.3724	-0.23173333
7dias	1.48283333	1.8636	-0.38076667

Tabla comparativa del grupo control positivo con los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, Catdex, fotocoagulación, Fototermia) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*, 24 horas después de la inoculación y una semana después de la inoculación.

TIEMPO	Catdex	Fotocoagulacion	Δ
Antes	1.826333333	2.1405	-0.31416667
24 hr	1.623833333	0.4915	1.13233333
7dias	2.278666667	2.1405	0.13816667
TIEMPO	Catdex	Fototerapia	Δ
Antes	1.826333333	1.727666667	0.09866667
24 hr	1.623833333	1.492	0.13183333
7dias	2.278666667	2.0644	0.21426667
TIEMPO	Catdex	Clindamicina	Δ
Antes	1.826333333	1.620833333	0.2055
24 hr	1.623833333	1.3724	0.25143333
7dias	2.278666667	1.8636	0.41506667

Tabla comparativa del grupo Catdex con los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, fotocoagulación, Fototerapia) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*, 24 horas después de la inoculación y una semana después de la inoculación

TIEMPO	Fototerapia	Fotocoagulacion	Δ
Antes	1.727666667	2.1405	-0.41283333
24 hr	1.492	0.4915	1.0005
7dias	2.0644	2.1405	-0.0761
TIEMPO	Fototerapia	Catdex	Δ
Antes	1.727666667	1.826333333	-0.09866667
24 hr	1.492	1.623833333	-0.13183333
7dias	2.0644	2.278666667	-0.21426667
TIEMPO	Fototerapia	Clindamicina	Δ
Antes	1.727666667	1.620833333	0.10683333
24 hr	1.492	1.3724	0.1196
7dias	2.0644	1.8636	0.2008

Tabla comparativa del grupo de la Fototerapia con los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, fotocoagulación, Catdex) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*, 24 horas después de la inoculación y una semana después de la inoculación.

TIEMPO	Clindamicina	Fotocoagulacion	Δ
Antes	1.62083333	2.1405	-0.51966667
24 hr	1.3724	0.4915	0.8809
7dias	1.8636	2.1405	-0.2769
TIEMPO	Clindamicina	Catdex	Δ
Antes	1.62083333	1.82633333	-0.2055
24 hr	1.3724	1.62383333	-0.25143333
7dias	1.8636	2.27866667	-0.41506667
TIEMPO	Clindamicina	Fototerapia	Δ
Antes	1.62083333	1.72766667	-0.10683333
24 hr	1.3724	1.492	-0.1196
7dias	1.8636	2.0644	-0.2008

Tabla comparativa del grupo de la clindamicina con los diferentes grupos experimentales (Catdex, fotocoagulación, Fototerapia) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*, 24 horas después de la inoculación y una semana después de la inoculación.

TIEMPO	Fotocoagulacion	Catdex	Δ
Antes	2.1405	1.82633333	0.31416667
24 hr	0.4915	1.62383333	-1.13233333
7dias	2.1405	2.27866667	-0.13816667
TIEMPO	Fotocoagulacion	Catdex	Δ
Antes	2.1405	1.72766667	0.41283333
24 hr	0.4915	1.492	-1.0005
7dias	2.1405	2.0644	0.0761
TIEMPO	Fotocoagulacion	Catdex	Δ
Antes	2.1405	1.62083333	0.51966667
24 hr	0.4915	1.3724	-0.8809
7dias	2.1405	1.8636	0.2769

Tabla comparativa del grupo de la fotocoagulación con los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, Catdex, Fototerapia) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*, 24 horas después de la inoculación y una semana después de la inoculación.

	Catdex	Fotocoagulación	Fototerapia	Clindamicina	Control +	Control -
Antes	1.82633333	2.1405	1.72766667	1.62083333	1.98233333	2.4955

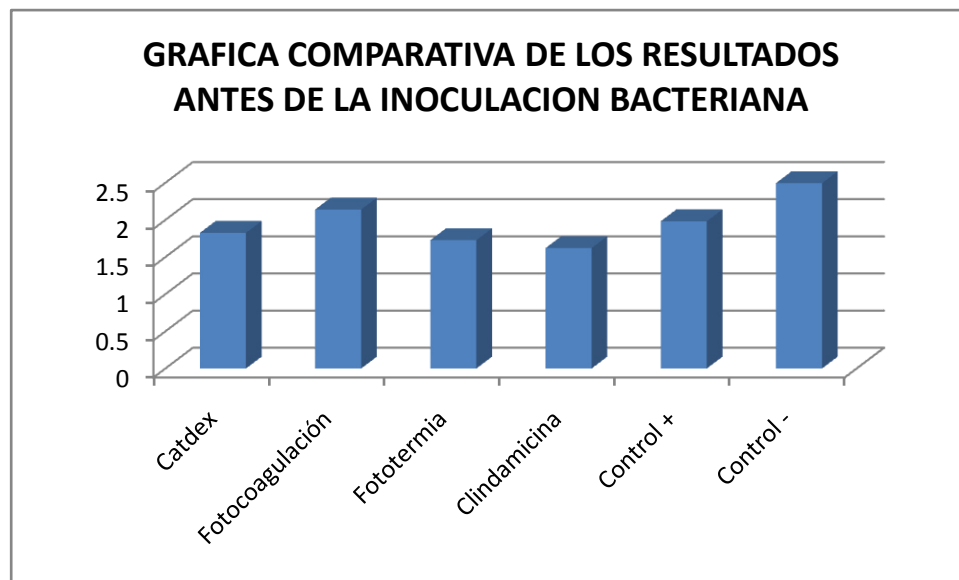


Tabla y grafica comparativa de los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, fotocoagulación, Fototerapia, Catdex) antes de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*.

	Catdex	Fotocoagulación	Fototermia	Clindamicina	Control +	Control -
24 hrs	1.62383333	0.4915	1.492	1.3724	1.14066667	1.64766667

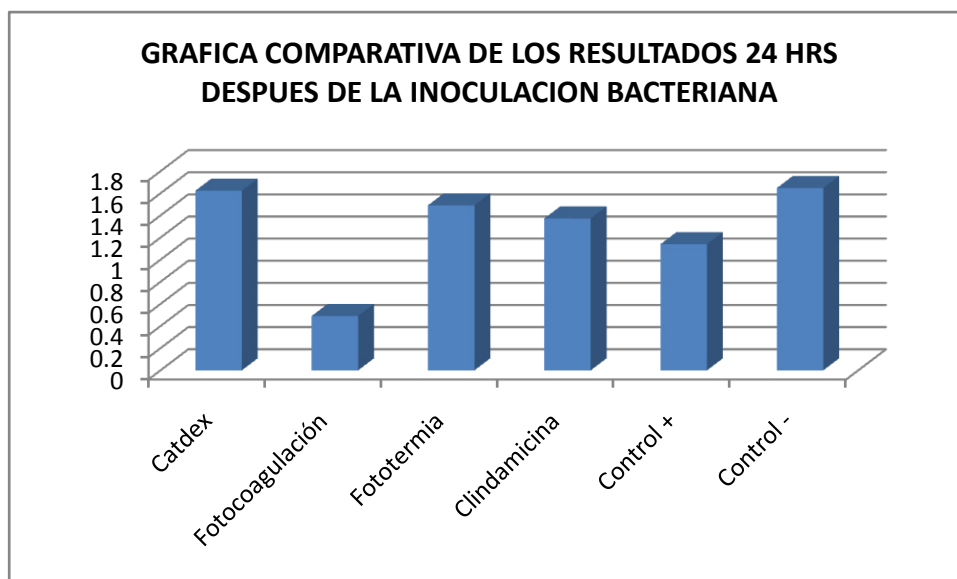


Tabla y gráfica comparativa de los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, fotocoagulación, Fototermia, Catdex) 24 horas después de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*.

	Catdex	Fotocoagulación	Fototermia	Clindamicina	Control +	Control -
7 Dias	2.27866667	2.1405	2.0644	1.8636	1.48283333	1.6024

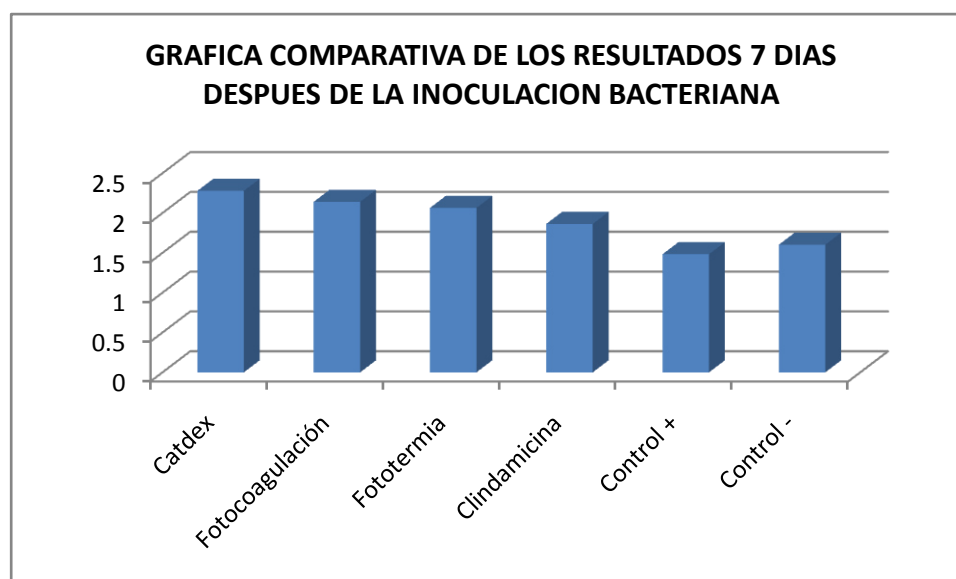
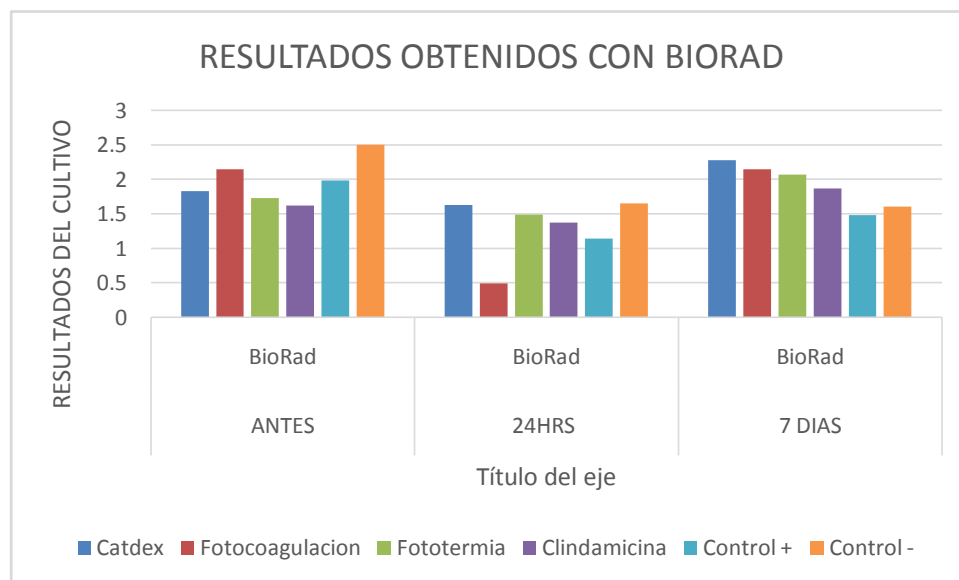
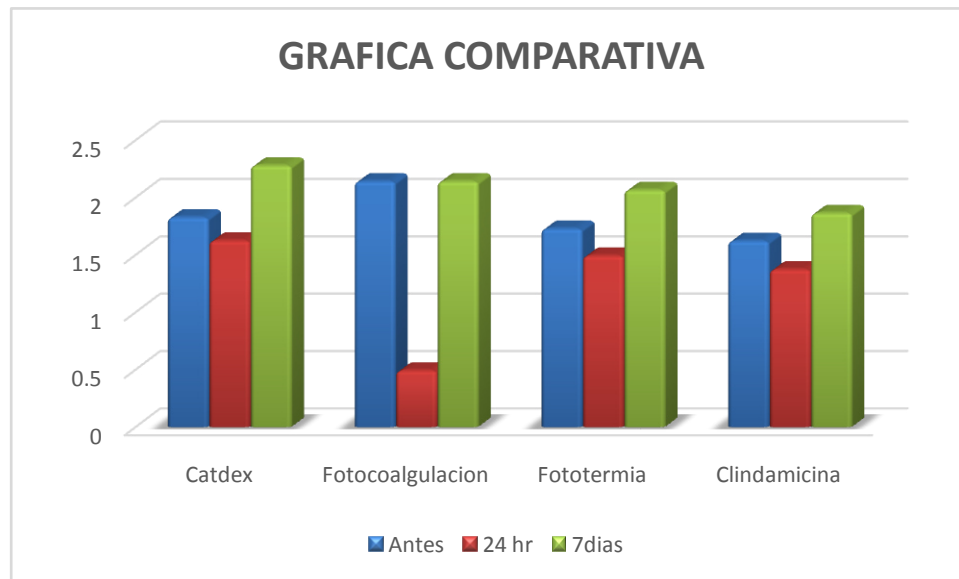


Tabla y gráfica comparativa de los diferentes grupos experimentales (Clindamicina, fotocoagulación, Fototermia, Catdex) una semana después de la inoculación bacteriana con *S. gordonii*.

Graficas comparativas de los resultados del cultivo realizado entre los diferentes grupos de experimentación (Catdex, fotocoagulación, Fototermia, Clindamicina) antes de la inoculación, 24 horas posteriores a la inoculación y 7 días después de la inoculación con *S. gordonii*.



DISCUSION

La ratas el animal de experimentación más utilizado en investigaciones biomédicas, especialmente en fisiología, toxicología, farmacología, comportamiento, inmunología y oncología. En este estudio se utilizó la rata y no el ratón por su mayor tamaño, mejor manipulación y visualización dentaria durante osteotomía mandibular como simulación de extracción dental.

Con el fin de entender mejor la fisiopatología de la osteonecrosis Inducida por Bifosfonatos y poder desarrollar un enfoque terapéutico. Se realizó este estudio en ratas Wistar, por ser esta un modelo de animal fiable, reproducible y de fácil mantenimiento.

En los estudios realizados en el año 2015 por Moñivas Palomero C., García López et al, se administró ácido Zolendróico subcutánea con una extracción dental en ratas Wistar, se observó ligera inflamación sin evidencia de infección, no compatible histopatológicamente con osteonecrosis de los maxilares, sin embargo, sabemos que el bifosfonato está diseñado para ser administrado de manera intravenosa, motivo por el cual, nos vimos en la necesidad de realizar esta investigación con la administración intravenosa para comprender mejor la aparición de osteonecrosis. La mandíbula de estos animales tiene gran densidad ósea y resistencia, y las raíces tienden a presentar cementosis perirradicular cuando son adultas. Esto hace que la exodoncia de los molares sea difícil, con alta probabilidad a la fractura radicular (Gottardello KZ et al, 2007).

En general los animales mostraron buena hemostasia y rápida recuperación de la anestesia, sin embargo, es importante saber ajustar las dosis del anestésico para evitar alteraciones respiratorias o cardíacas y por consecuencia la muerte del animal disminuyendo el tamaño de muestra.

Distintos estudios con ratas Wistar con tratamiento de ZA, contemplaron clínicamente retraso en la cicatrización y ulceraciones, inflamación y necrosis, como igualmente ocurre en humanos. Los bifosfonatos liberados son tóxicos para el epitelio y pueden inhibir en la proliferación y la cicatrización.

Al comparar los datos obtenidos mediante unidades Hounsfield de la densidad ósea del lado izquierdo (lado afectado) y el lado derecho (lado no afectado) mediante la imagenología en 3D, se pudieron observar ligeros cambios como consecuencia de la administración IV, en la actualidad nos encontramos analizando estudios complementarios como histopatología y densitometría ósea para poder corroborar los datos obtenidos de nuestro estudio.

CONCLUSION

Se creo un modelo de investigación animal (rata Wistar) donde se observó clínicamente que la administración de Ácido Zolendrónicopor vía intravenosa durante cuatro semanas y 3 semanas después de la osteotomía en la región mandibular del lado izquierdo, hubo alteraciones clínicas como el retraso en la cicatrización con ligera exposición de tejido óseo con ligera epitelización en la periferia de la osteotomía. Situación compatible con osteonecrosis mandibular por bifosfonatos similar a la que se produce en humanos según la Asociación Americana de Cirugía Oral y Maxilofacial.

Con las dosis y tiempos empleados en nuestro estudio hubo cambios en la densidad ósea del lado izquierdo (lado afectado) en comparación con el lado derecho (lado no afectado) como consecuencia de la administración por vía intravenosa del bifosfonato (Ácido Zolendrónico), ya que según la literatura, la administración por vía intravenosa tiene mayor probabilidad de presentar Osteonecrosis mandibular y alteraciones sistémicas, comprobamos los cambios en la densidad ósea mediante las unidades Hounsfield de la imagenología en 3D (Cone Beam). Cabe mencionar que diversos estudios realizados anteriormente en ratas, el bifosfonato fue administrado por vía subcutánea, por lo tanto, no hubo estudios que reportaran alteraciones radiológicas ni histopatológicas (*Moñivas et al., 2015*).

Se necesitarían hacer más estudios con bifosfonatos, en diferentes dosis, vías de administración e intervalos, para comprender mejor la aparición de la Osteonecrosis mandibular inducida por bifosfonatos.

Mediante la realización de este estudio experimental hemos llegado a las conclusiones:

- La aplicación del bifosfonato por vía intravenosa por la vena caudal una vez por semana durante 4 semanas, provoco cambios clínicos relacionados con el retraso en la cicatrización en el lugar de la osteotomía mandibular izquierda.
- La aplicación de bifosfonatos por vía intravenosa afecta de manera sistémica con cambios morfológicos renales, hepáticos y cerebrales.

- Al comparar los datos obtenidos mediante unidades Hounsfield de la densidad ósea del lado izquierdo (lado afectado) y el lado derecho (lado no afectado) mediante la imagenología en 3D, se pudieron observar ligeros cambios como consecuencia de la administración IV, en la actualidad nos encontramos analizando estudios complementarios como histopatología y densitometría ósea para poder corroborar los datos obtenidos.

RECOMENDACIONES

A continuación, se presentan algunas sugerencias e ideas para futuras investigaciones que puedan seguir incrementando los conocimientos en esta área:

- Realizar el mismo protocolo de investigación con las siguientes variantes:
 - Administrar el bifosfonato vía intravenosa durante mayor tiempo
 - Aumentar o variar la dosis de los bifosfonatos entre más grupos experimentales.
- Variar la dosis o tipo de anestésico utilizado para disminuir los riesgos de alteraciones respiratorias o cardíacas en las ratas Wistar.
- Realizar un estudio similar en otro tipo de animales experimentales que sean permitidos como conejos o mini pigs para evaluar la respuesta.

REFERENCIAS

1. Meurling L, Márquez M, Nilsson S and Holmberg A.R. Polymer-conjugated guanidine is a potentially useful anti-tumor agent. *Inter J Oncology* 35: 281-285, 2009.
2. Florence Daubine. Ronan Le Bot, Marcela Márquez, Sten Nilsson, Torbjorn Schröder and Anders R. Holmberg. Treatment of bone metastasis in prostate cancer: efficacy of a novel polybisphosphonate. *Anticancer Res* 31:4141-4146, 2011.
3. Erandi Escamilla-García, Andrea G. Alcázar-Pizaña, Myriam A. de la Garza-Ramos, Carlos E. Medina-De la Garza, Marcela Márquez, Anders R. Holmberg. Antimicrobial activity of CatDex against *Porphyromonas gingivalis*-W83 and *Streptococcus mutans*-UA130.

Abstract:IADR Internacional Association for Dental Research. WA USA March 2-23, 2013.
4. Ayodele Alaiya, Jonathan Fox, Steve Boris, Goran Matic, Zakia Shinwari, Eman Barhoush, Marcela Márquez, Sten Nilsson and Anders R. Holmberg. Proteomic analysis of soft tissue tumor implants treated with a novel Polybisphosphonate *Cancer Genomics & Proteomics*, 11: 39-50, 2014.
5. Ayodele Alaiya, Zakia Shinwari, Eman Barhoush, Steve Bobis, Goran Matic, Chaker Adra, Marcela Márquez, Sten Nilsson and Anders R. Holmberg. Treatment efficacy of a novel polybisphosphonate on soft tissue tumor lesions.

12th Human proteome organization world congress (HUPO 2013), Pacifico Yokohama, Japan, 14-18 September, 2013.
6. Anders R. Holmberg, Marcela Márquez, Lennart Meuling, Al.,aiya Ayodele, Rolf Lerner, Sten Nilsson Pro apoptotic properties of a novel poly bisphosphonate 15th World Congress on advances in Oncology and 13th International Symposium on Molecular Medicine, Lutski, 7-10 Oct, 2010.

7. Erandi Escamilla-García, Andrea G Alcázar-Pizaña, Juan C Segoviano-Ramírez, Casiano Del Ángel-Mosqueda, Ada P López-Lozano, Carlos E Medina-De la Garza, Marcela Márquez-Mand Myriam A De La Garza-Ramos. Efficacy of a Novel Antimicrobial Agent Tested in Two Oral Bacteria. Manuscrito.
8. Al Ghamdi, K. M., Kumar, A., and Moussa, N. A. (2012). Low-level laser therapy: A useful technique for enhancing the proliferation of various cultured cells. *Lasers in Medical. Science*.
9. Asai, T., Suzuki, H., Takeuchi, J. and Komori, T. (2014). Photomedicine and Laser Surgery. Effectiveness of Photocoagulation Using an Nd:YAG Laser for the Treatment of Vascular Malformations in the Oral Region Retrieved from <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/24392965>
10. Azevedo, L., Del Vecchio, A., Nakajima, E., Galletto, V., & Migliari, D. (2013). Lip and oral venous varices treated by photocoagulation with high-intensity diode laser. *Quintessence International*. 44(2), 171–174.
11. Basi, D. L. (2008). Zoledronic Acid Disrupts VEGFR2 Intracellular Trafficking in Endothelial Cells. *Journal Oral Maxillofacial Surgery*, 66(8), 66–67.
12. Bi, Y., Gao, Y., Ehrichtou, D., Cao, C., Kikuri, T., Le, A., Zhang, L. (2010). Bisphosphonates cause osteonecrosis of the jaw-like disease in mice. *The American Journal Pathology*, 177, 280–290.
13. Bonsor, S J., Nichol, R., Reid, T. M. S., & Pearson, G. J. (2006). Microbiological evaluation of photo-activated disinfection in endodontics (An in vivo study). *Br Dent J*, 200(6), 337–341. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/sj.bdj.4813371>
14. Dickers, B., Lamard, L., Peremans, A., Geerts, S., Lamy, M., Limme, M., Nammour, S. (2009). Temperature rise during photo-activated disinfection of root canals. *Lasers in Medical. Science*, 24, 81–85.
15. Drake, M. T., Clarke, B. L., & Khosla, S. (2008). Bisphosphonates: mechanism of action and role in clinical practice. *Mayo Clinic Proceedings*, 83(9), 1032–45. Retrieved from <http://www.pubmedcentral.nih.gov/articlerender.fcgi?artid=2667901&tool=pmc.ncbi&rendertype=abstract>

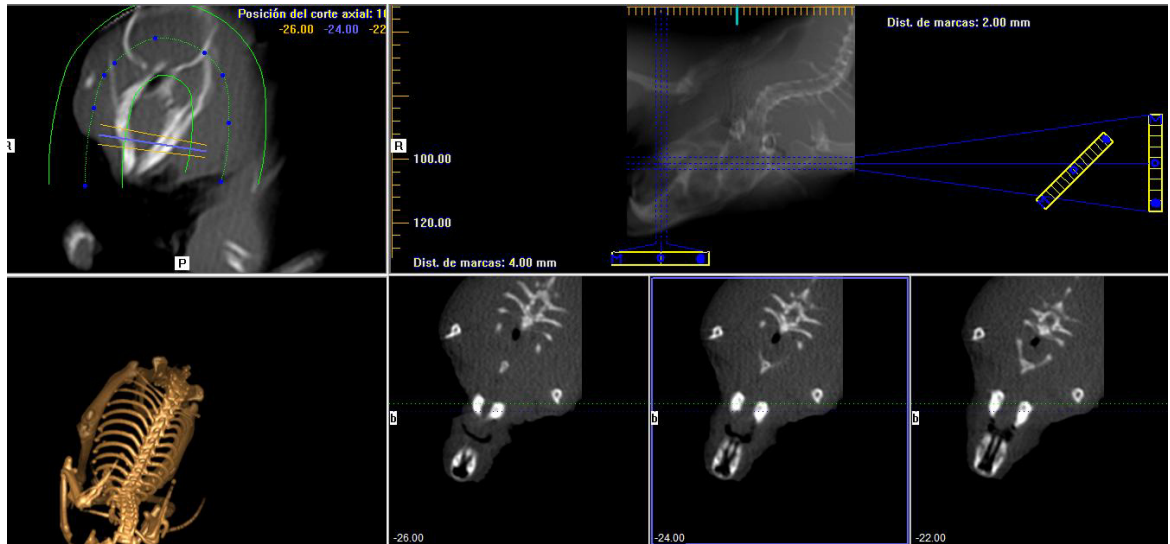
16. Ejiri, K., Aoki, A., Yamaguchi, Y., Ohshima, M. & Izumi, Y. (2013). High-frequency low-level diode laser irradiation promotes proliferation and migration of primary cultured human gingival epithelial cells. *Lasers in Medical., Science.* doi:10.1007/s10103-013-1292-7
17. Hirata, S., Kitamura, C., Fukushima, H., Nakamichi, I., Abiko, Y., Terashita, M., & Jimi, E. (2010). Low-level laser irradiation enhances BMP-induced osteoblast differentiation by stimulating the BMP/Smad signaling pathway. *Journal., of Cellular Biochemistry*, 111(6), 1445–1452.
18. Marx, R. E., Sawatari, Y., Fortin, M., & Broumand, V. (2005). Bisphosphonate-induced exposed bone (osteonecrosis/osteopetrosis) of the jaws: risk factors, recognition, prevention, and treatment. *Journal., of Oral., and Maxillofacial., Surgery* □: *Official., Journal., of the American Association of Oral., and Maxillofacial Surgeons*, 63(11), 1567–75. Retrieved from <http://www.sciencedirect.com/science/article/pii/S0278239105011870>
19. Marx, R. E., & Tursun, R. (2012a). Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: A blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 41, 283–289.
20. Marx, R. E., & Tursun, R. (2012b). Suppurative osteomyelitis, bisphosphonate induced osteonecrosis, osteoradionecrosis: A blinded histopathologic comparison and its implications for the mechanism of each disease. *International Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 41, 283–289.
21. Meurling, L., Marquez, M., Nilsson, S., & Holmberg, A. R. (2009). Polymer-conjugated guanidine is a potentially useful anti-tumor agent. *International., Journal., of Oncology*, 35, 281–285. doi:10.3892/ijo_00000338
22. Migliorati, C. A., Schubert, M. M., Peterson, D. E., & Seneda, L. M. (2005). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of mandibular and maxillary bone: An emerging oral complication of supportive cancer therapy. *Cancer.* doi:10.1002/cncr.21130

23. Miksad, R. A., Lai, K.-C., Dodson, T. B., Woo, S.-B., Treister, N. S., Akinyemi, O., Swan, J. S. (2011). Quality of life implications of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw. *The Oncologist*, 16, 121–132.
24. Miyazaki, H., Romeo, U., Ohshiro, T., Kudo, T., Makiguchi, T., Kawachi, N., Yokoo, S. (2013). Treatment strategies for large oral., venous mal.,formations using intralesional laser photocoagulation. *Lasers in Medical Science*, pp. 1–4.
25. Pushalkar, S., Li, X., Kurago, Z., Ramanathapuram, L. V, Matsumura, S., Fleisher, K. E., Saxena, D. (2014). Oral microbiota and host innate immune response in bisphosphonate-related osteonecrosis of the jaw. In *J Oral Sci*. Retrieved from <http://dx.doi.org/10.1038/ijos.2014.46>
26. Renno, A C M., McDonnell, P. A., Parizotto, N. A., & Laakso, E.-L. (2007). The effects of laser irradiation on osteoblast and osteosarcoma cell proliferation and differentiation *in vitro*. *Photomedicine and Laser Surgery*, 25(4), 275–280. doi:10.1089/pho.2007.2055
27. Rogers, M.J, Watts, D.J., Russel, R. G. (1997). Overview of bisphosphonates. *Cancer*, 15, 80; 1652–60.
28. Rugani, P., Acham, S., Truschnegg, A., Obermayer-Pietsch, B., & Jakse, N. (2010). Bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaws: Surgical treatment with ErCrYSGG-laser. Case report. *Oral Surgery, Oral Medicine, Oral Pathology, Oral Radiology and Endodontology*, 110(6).
29. Stein, A., Benayahu, D., Mal.,tz, L., & Oron, U. (2005). Low-level laser irradiation promotes proliferation and differentiation of human osteoblasts in vitro. *Photomedicine and Laser Surgery*, 23(2), 161–166.
30. Vescovi, P., Merigo, E., Manfredi, M., Meleti, M., Fornaini, C., Bonanini, M., Nammour, S. (2008). Nd:YAG laser biostimulation in the treatment of bisphosphonate-associated osteonecrosis of the jaw: clinical experience in 28 cases. *Photomedicine and Laser Surgery*, 26(1), 37–46.
31. Vescovi, P., Merigo, E., Meleti, M., Fornaini, C., Nammour, S., & Manfredi, M. (2007). Nd:YAG laser biostimulation of bisphosphonate-associated necrosis of the jawbone with and without surgical treatment. *British Journal of Oral and Maxillofacial Surgery*, 45(8), 628–632.

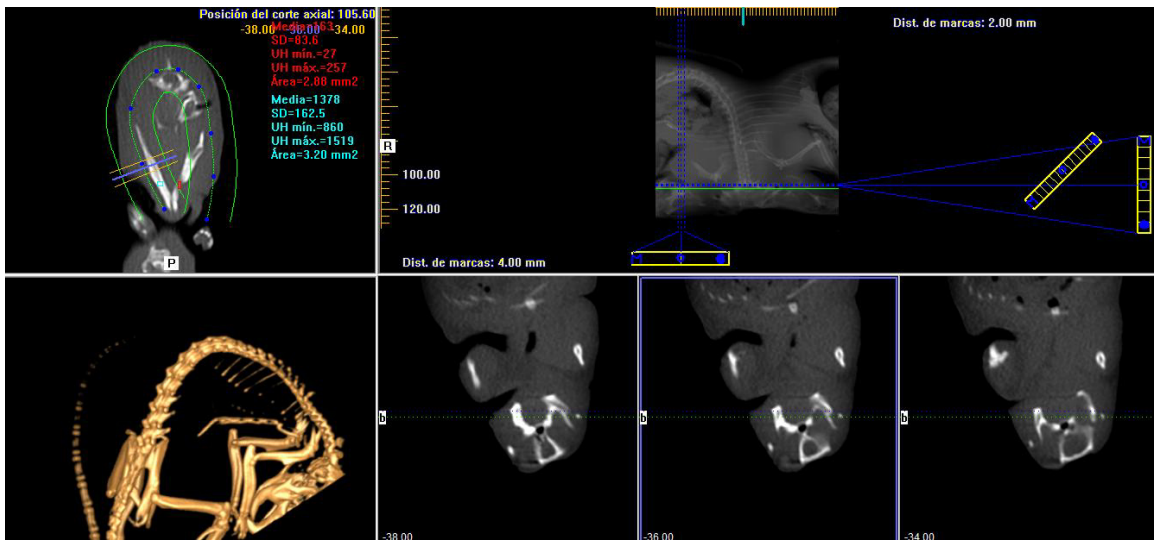
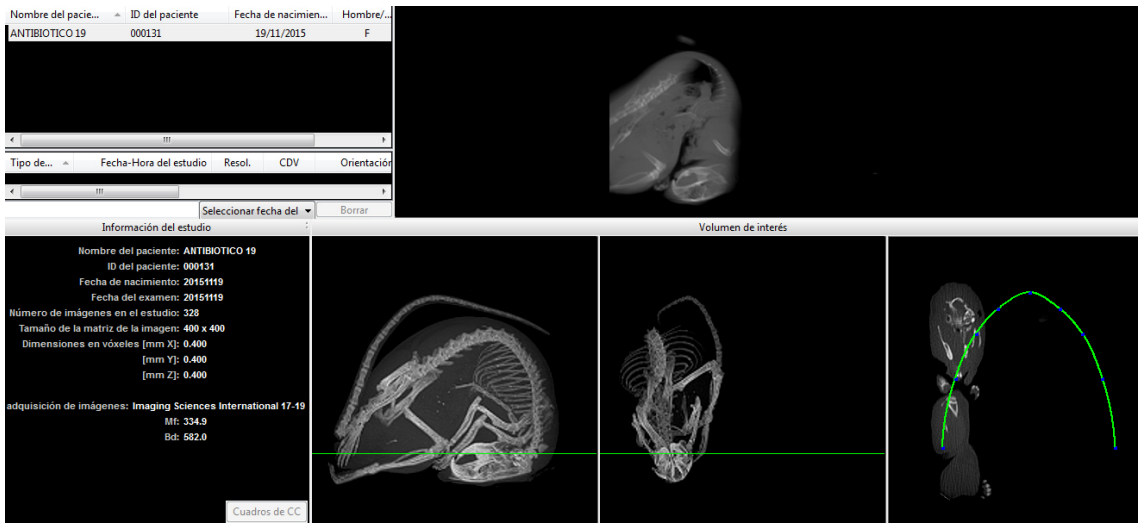
32. Vescovi, P., Merigo, E., Meleti, M., Manfredi, M., Fornaini, C., & Nammour, S. (2012). Surgical approach and laser applications in BRONJ osteoporotic and cancer patients. *Journal. of Osteoporosis*, 2012.
33. Williams, J. A., Pearson, G. J., & Colles, M. J. (2006). Antibacterial., action of photoactivated disinfection {PAD} used on endodontic bacteria in planktonic suspension and in artificial and human root canals. *Journal of Dentistry*, 34(6), 363–71. doi:10.1016/j.jdent.2005.08.002
34. Xu, X.-L., Gou, W.-L., Wang, A.-Y., Wang, Y., Guo, Q.-Y., Lu, Q., Peng, J. (2013). Basic research and clinical applications of bisphosphonates in bone disease: what have we learned over the last 40 years?.*Journal of Translational Medicine*, 11(1), 303. doi:10.1186/1479-5876-11-303

ANEXOS IMAGENOLOGICOS 3D

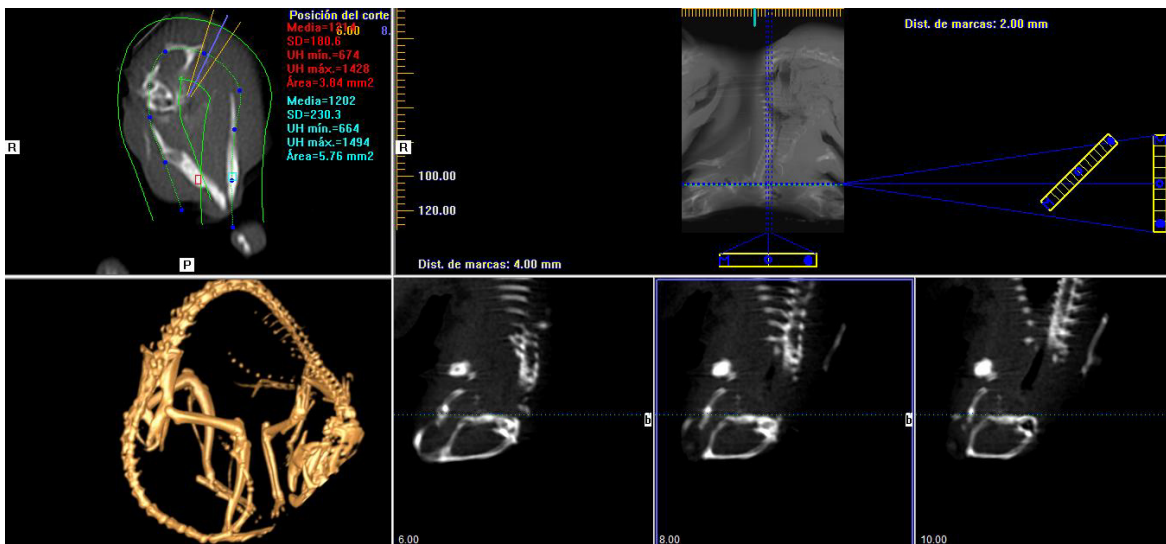
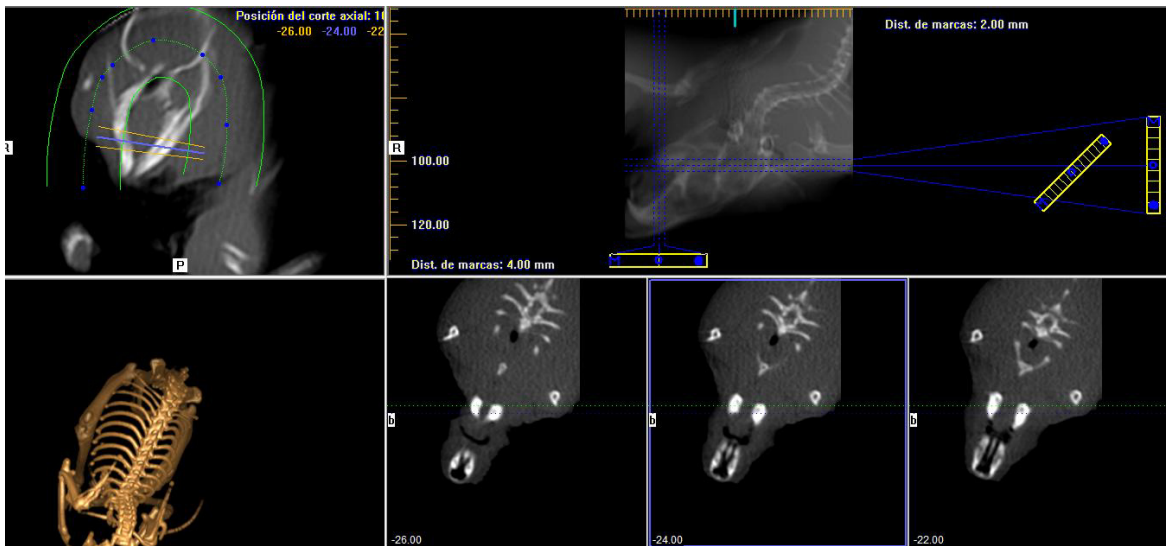
Rata número 21. Grupo Antibiótico



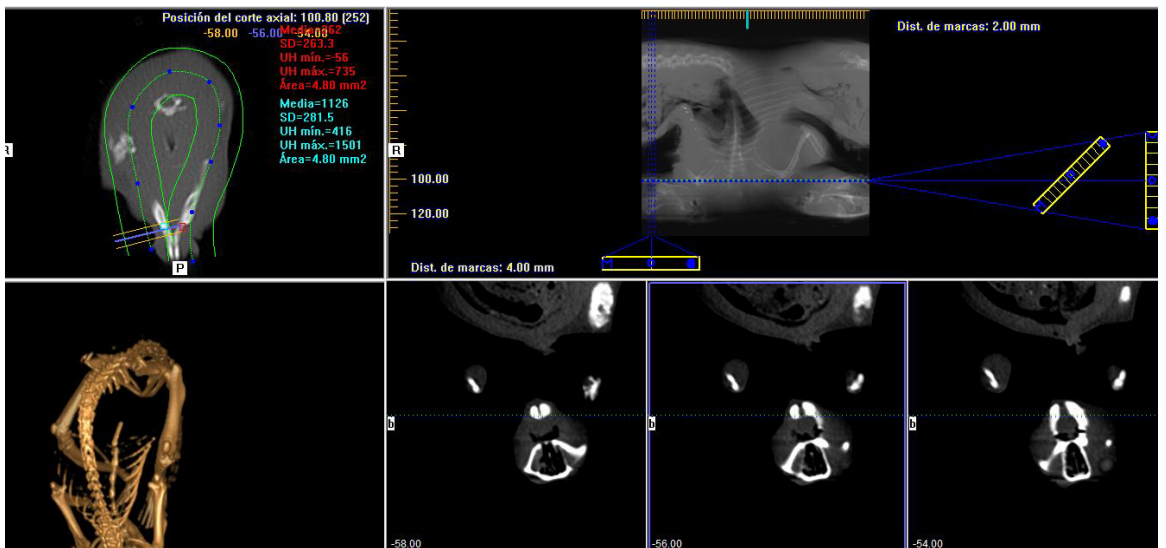
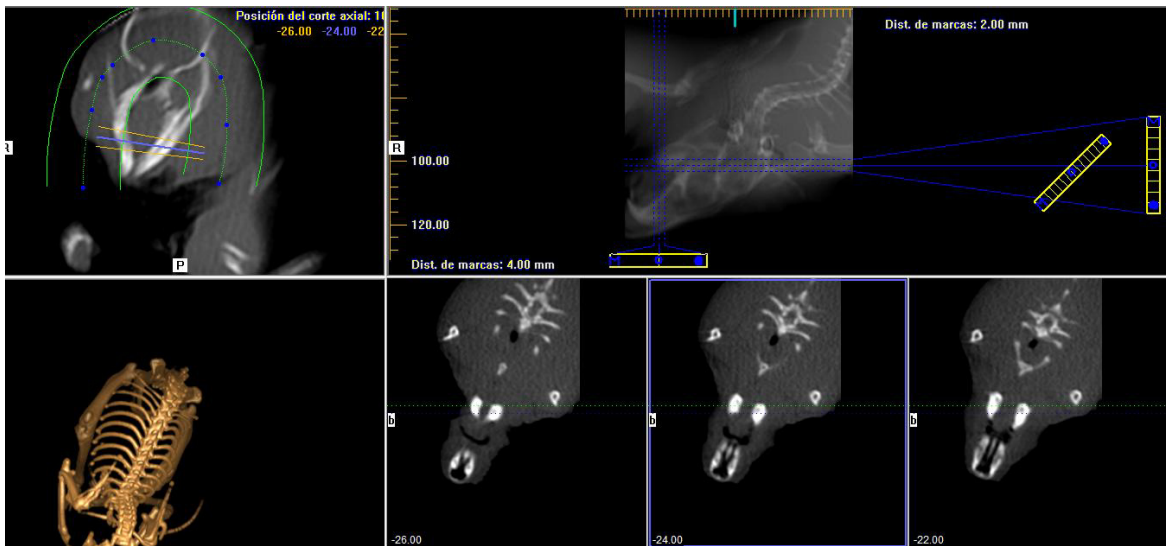
Rata número 19. Grupo Antibiótico



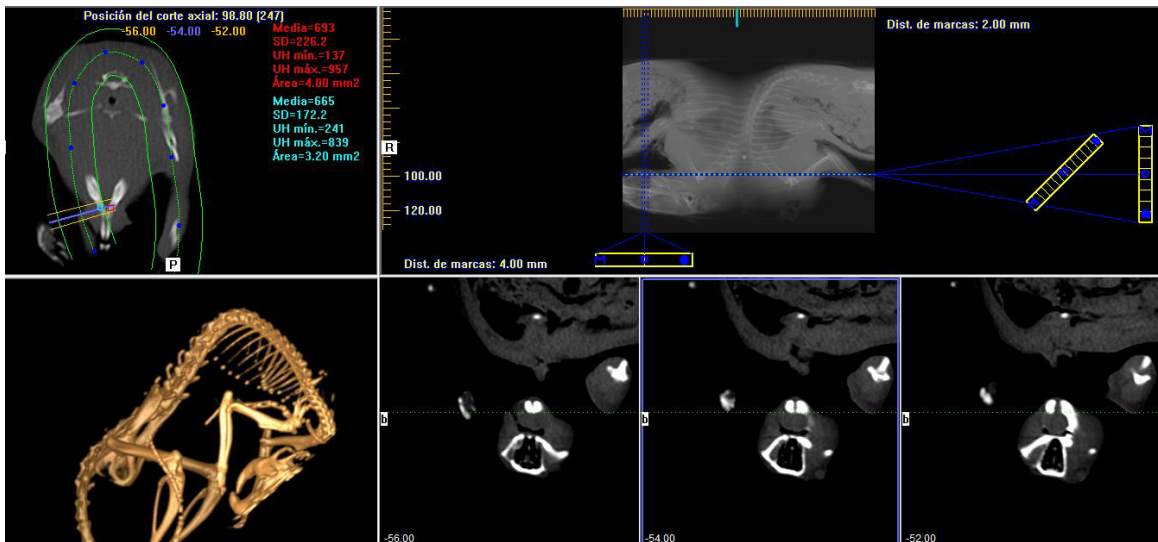
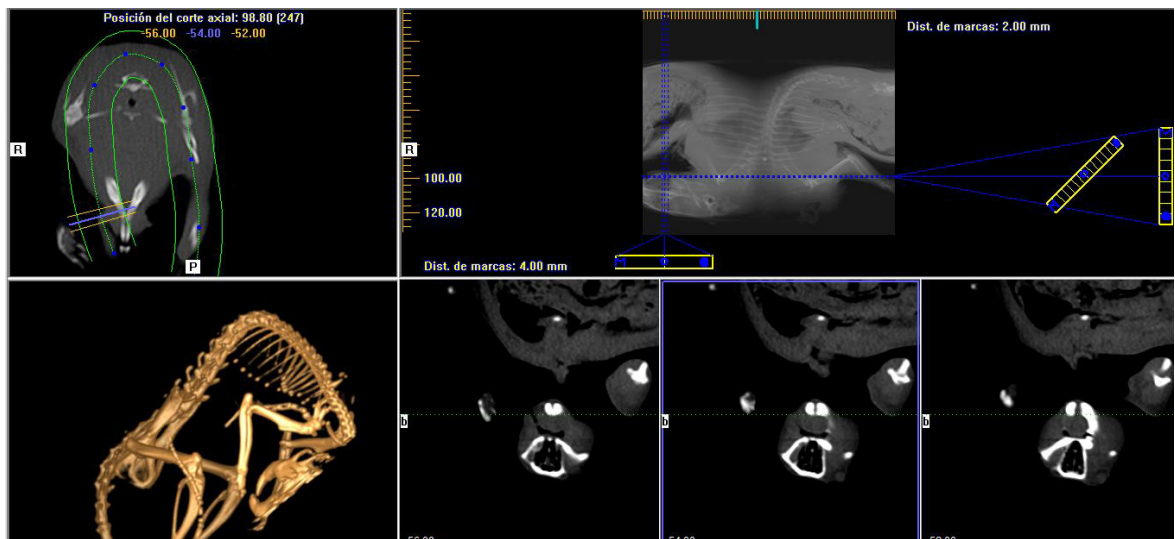
Rata número 20. Grupo Antibiótico



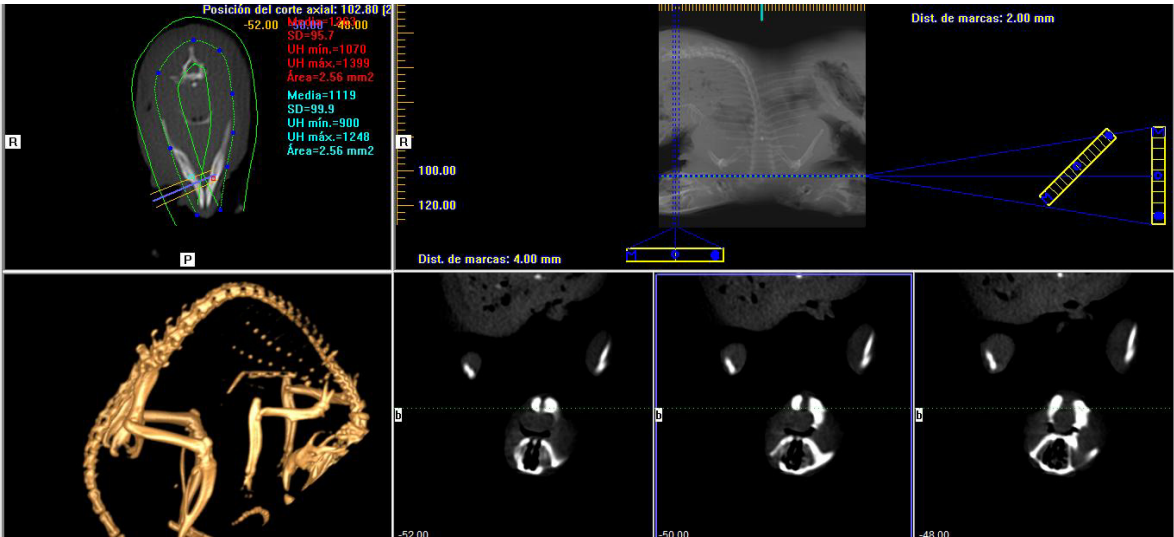
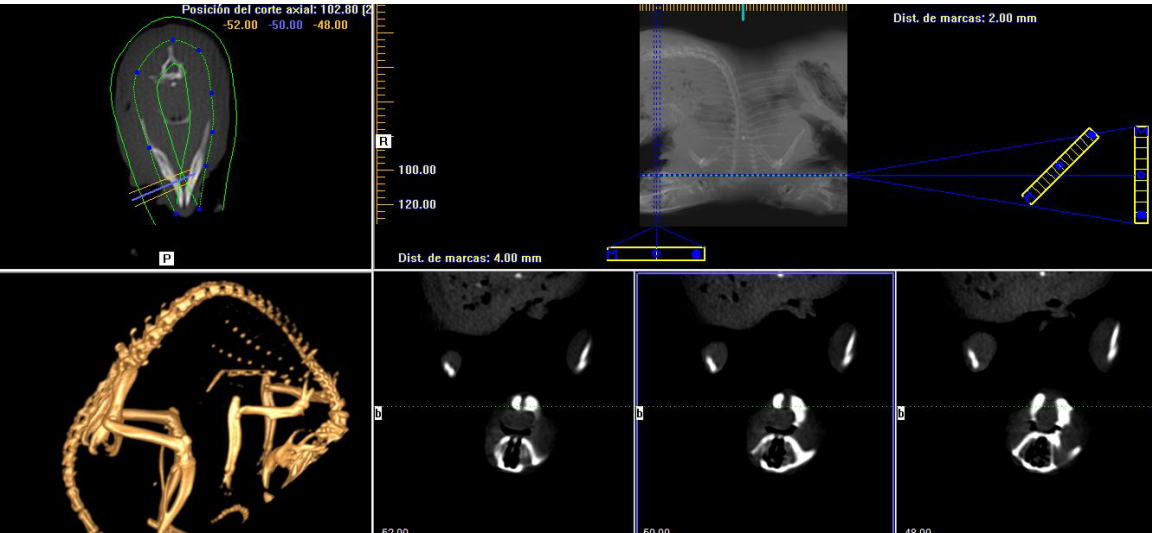
Rata número 22. Grupo Antibiótico



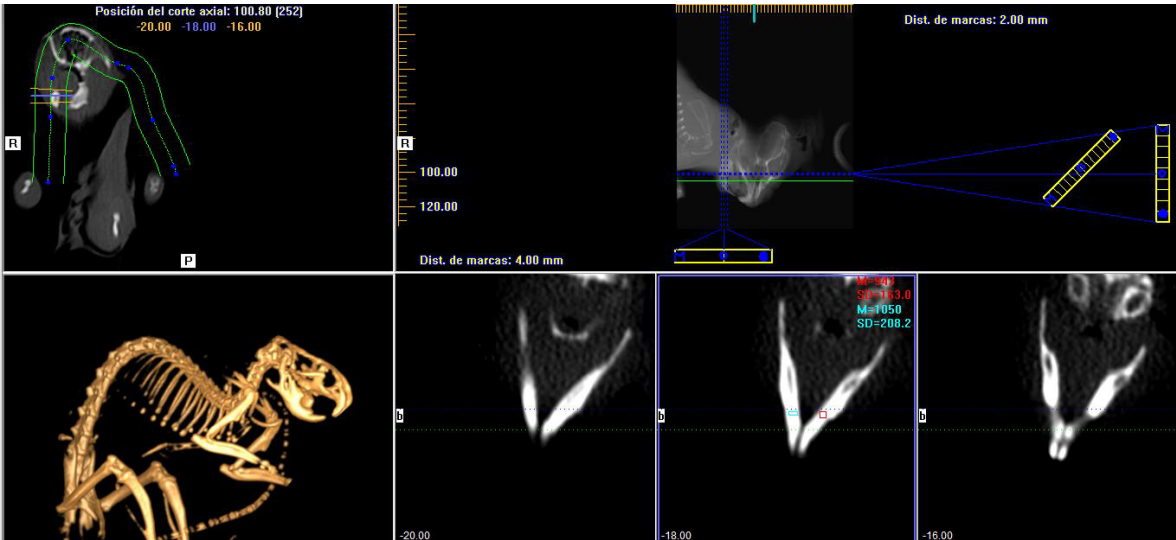
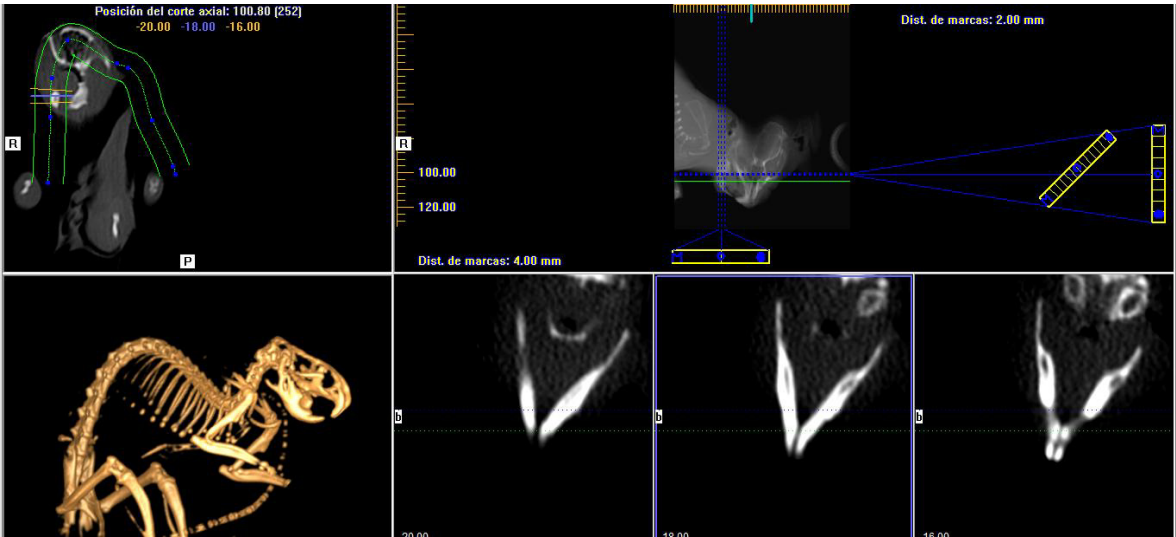
Rata número 23. Grupo Antibiótico



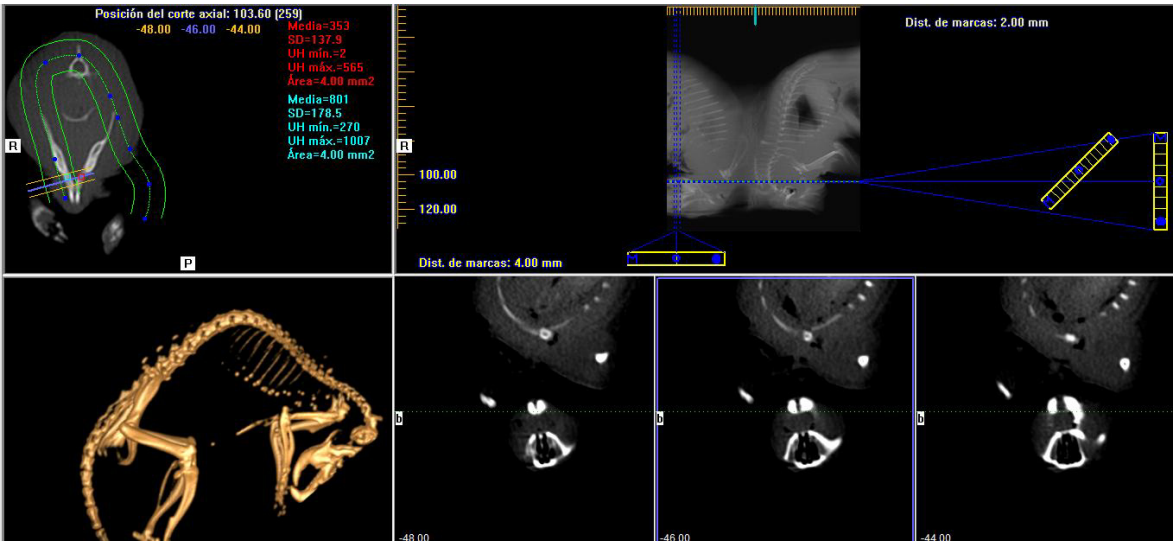
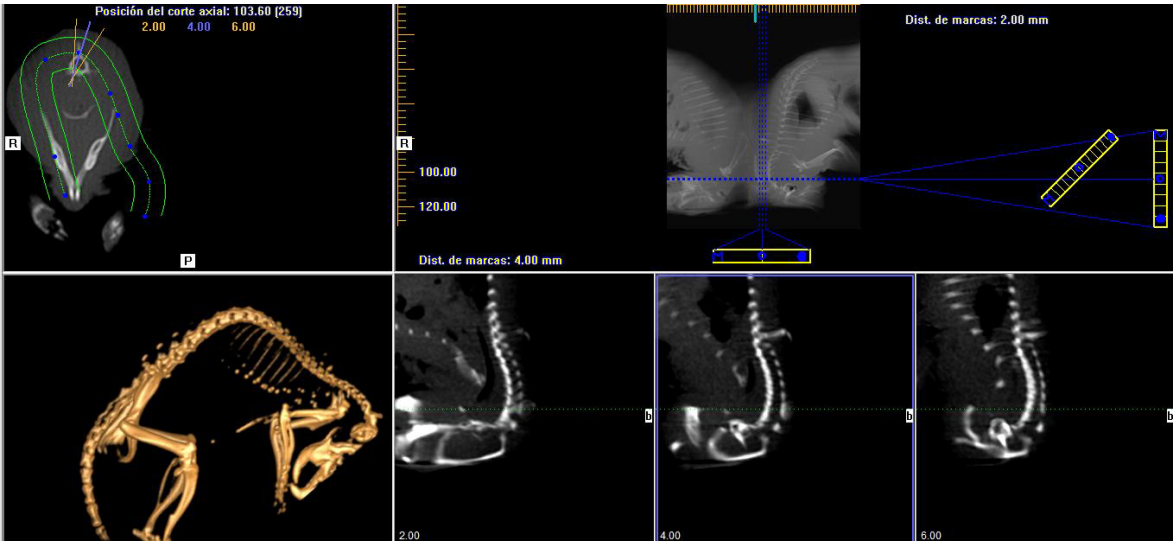
Rata Numero 6. Grupo Catdex



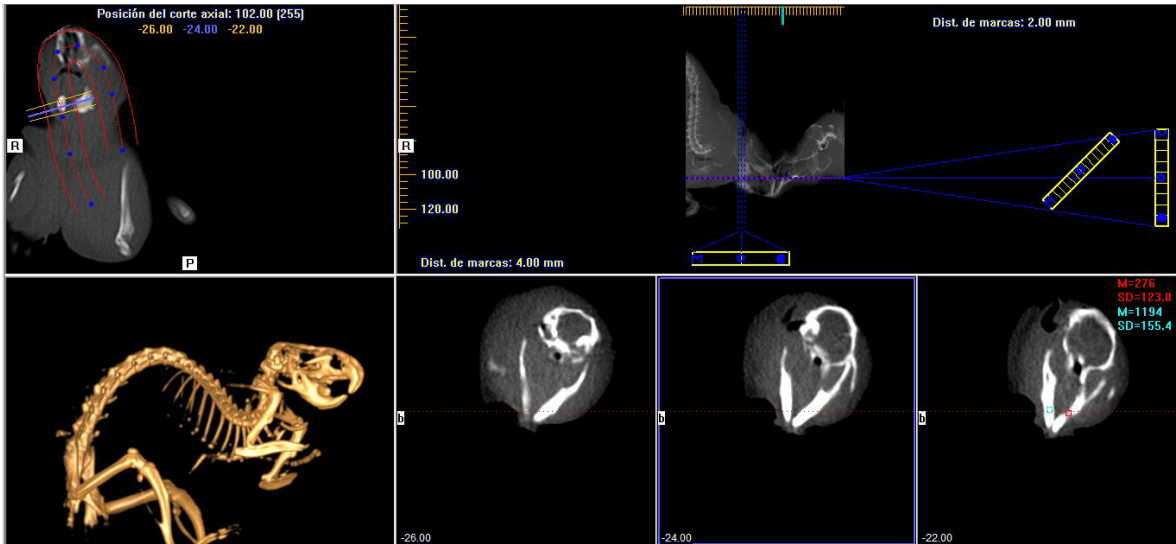
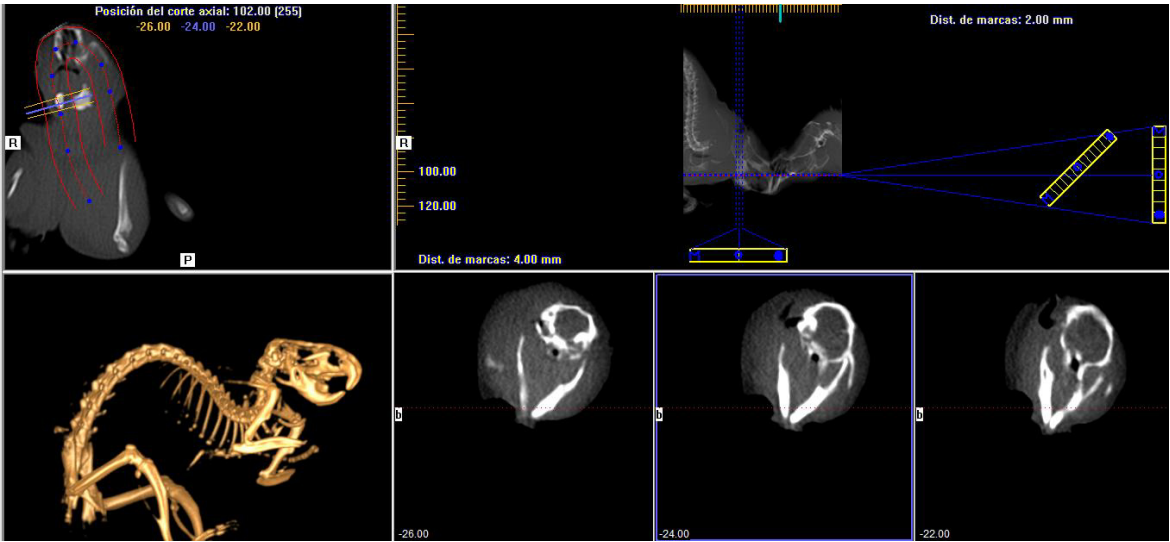
Rata Número 5, Grupo Catdex



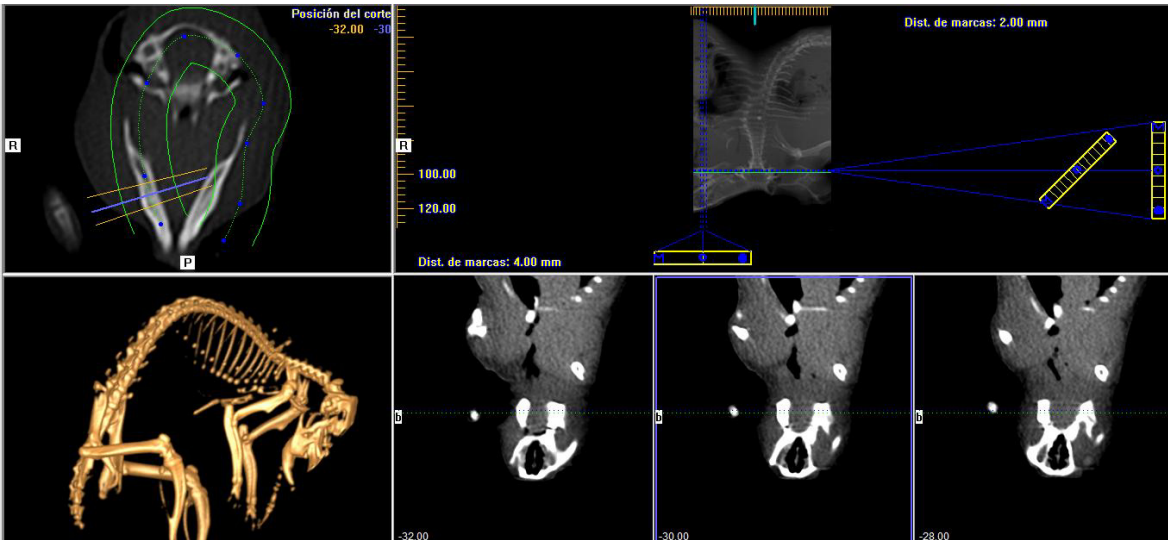
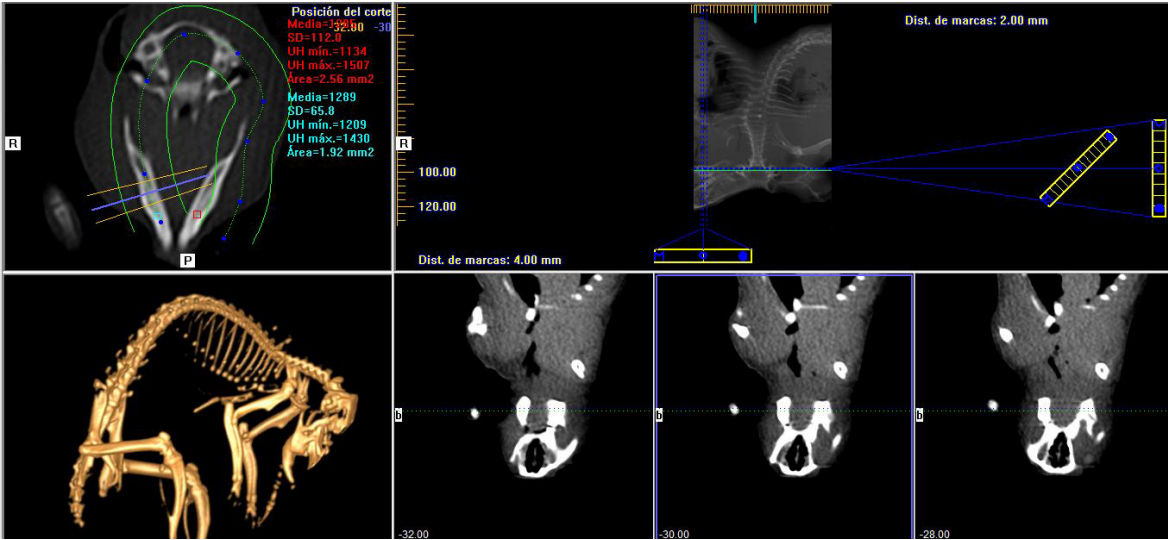
Rata Número 4. Grupo Catdex



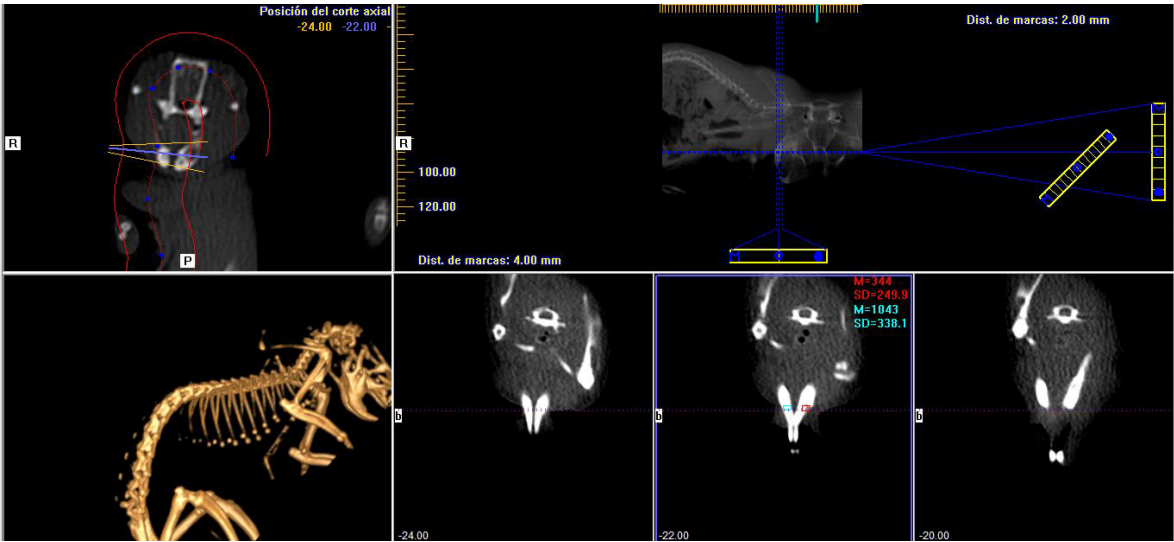
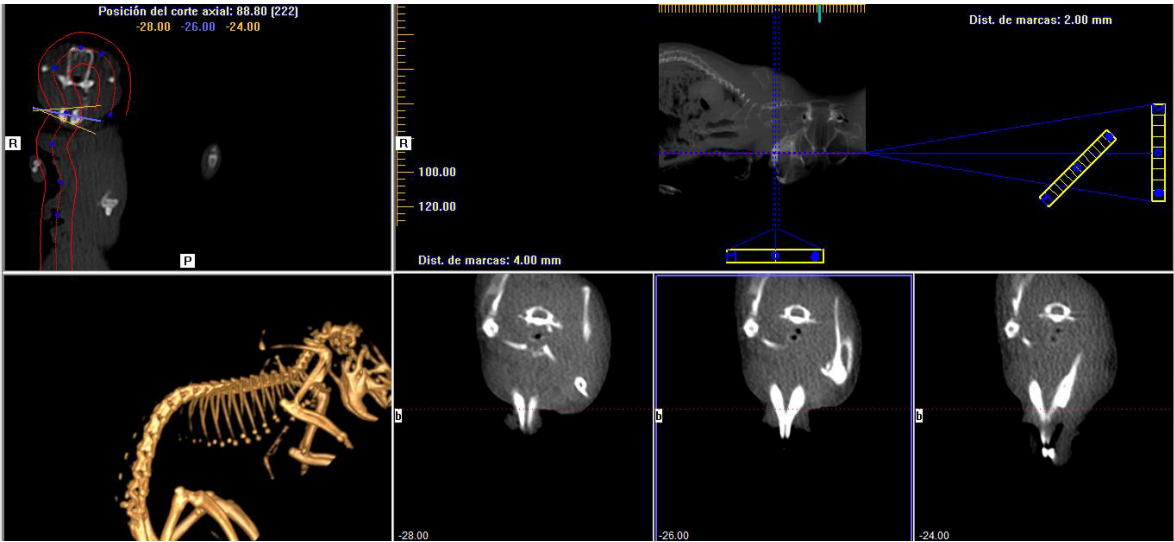
Rata Numero 3. Grupo Catdex



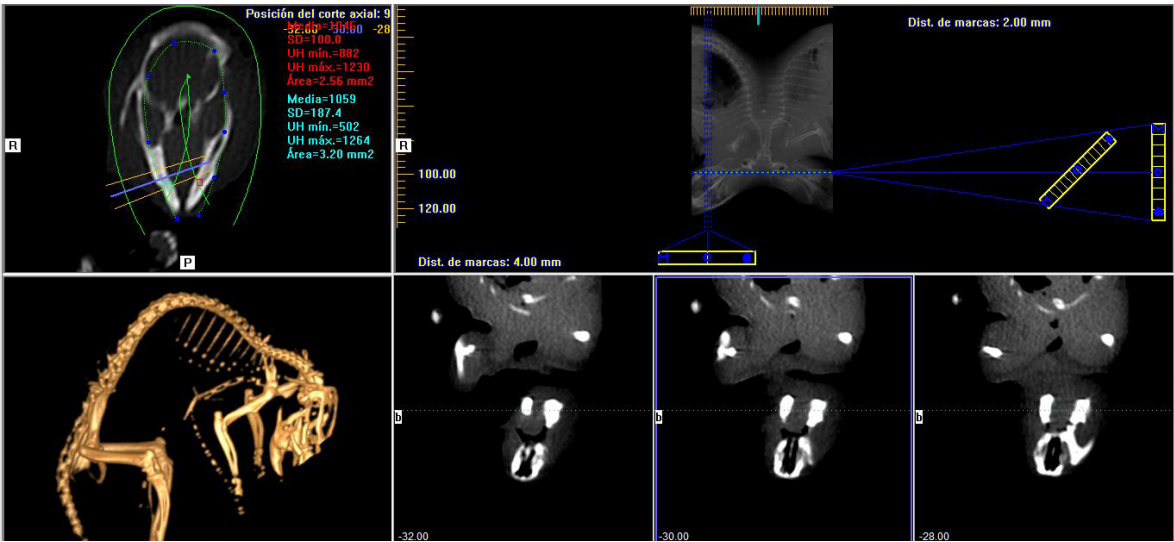
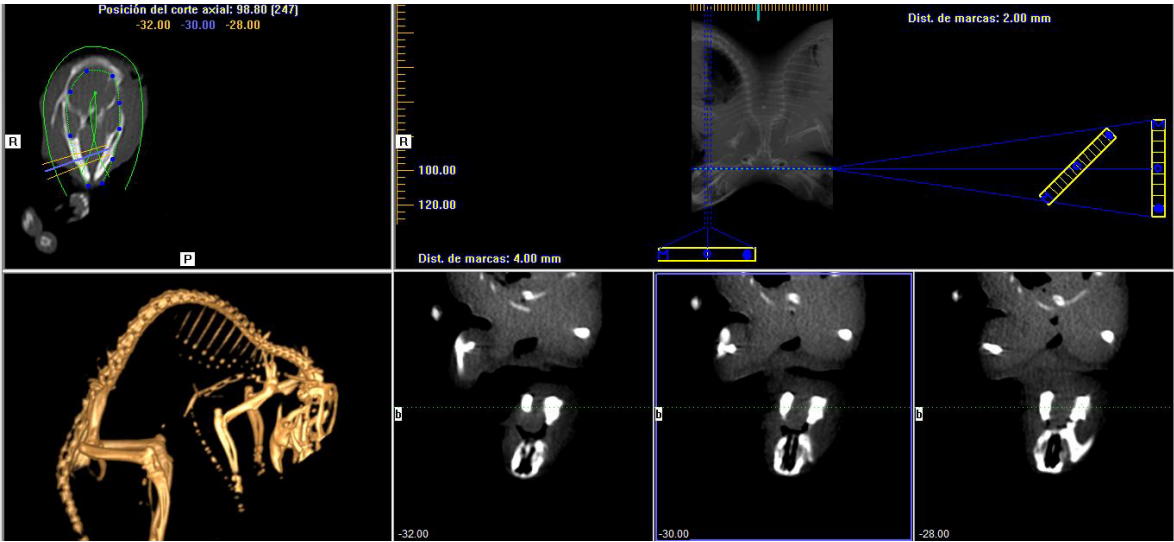
Rata Numero 2. Grupo Catdex



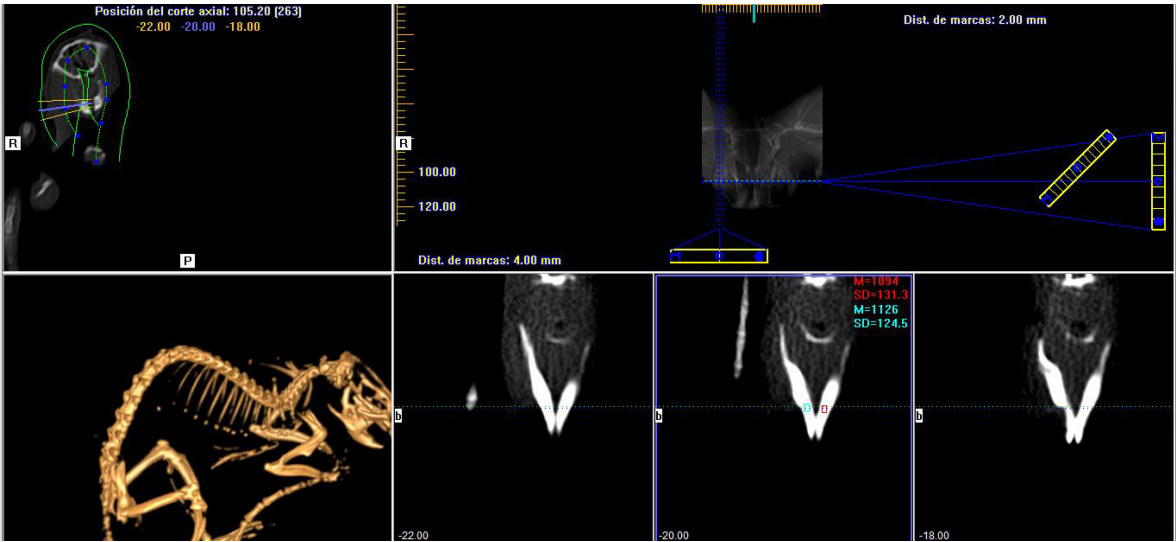
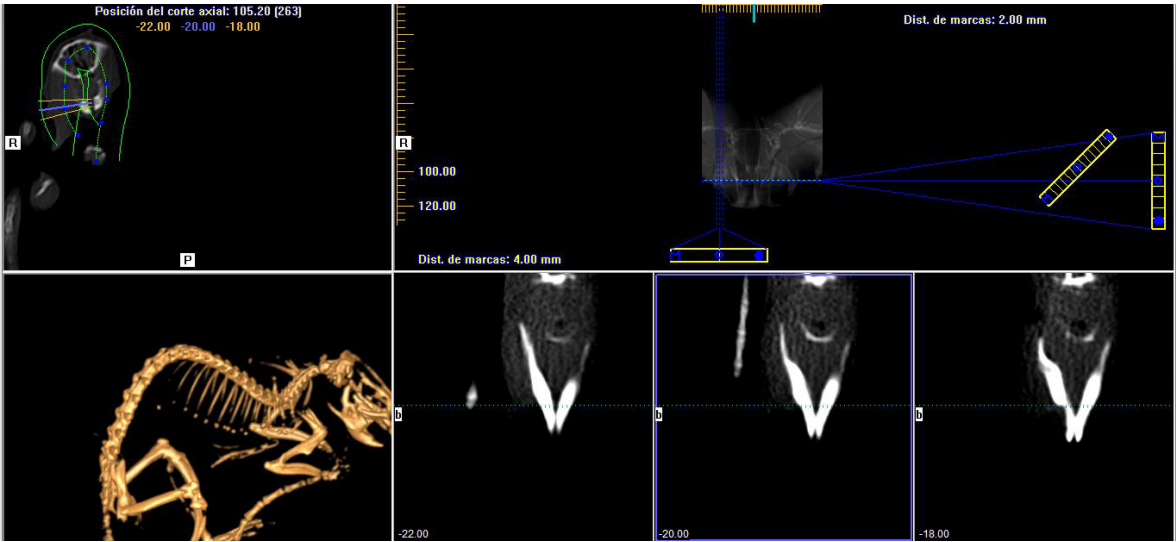
Rata número 1. Grupo Catdex



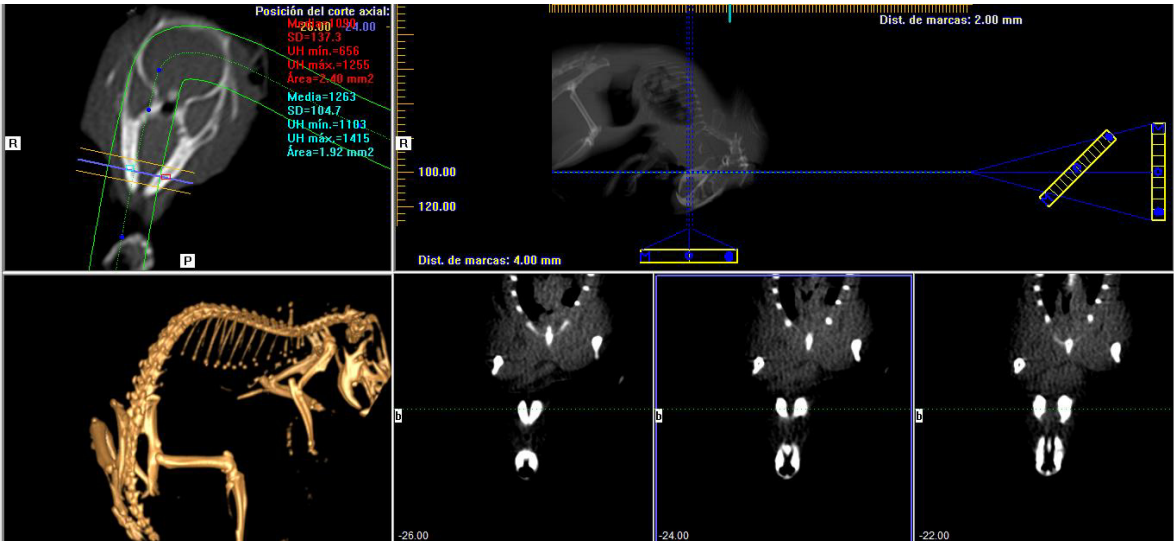
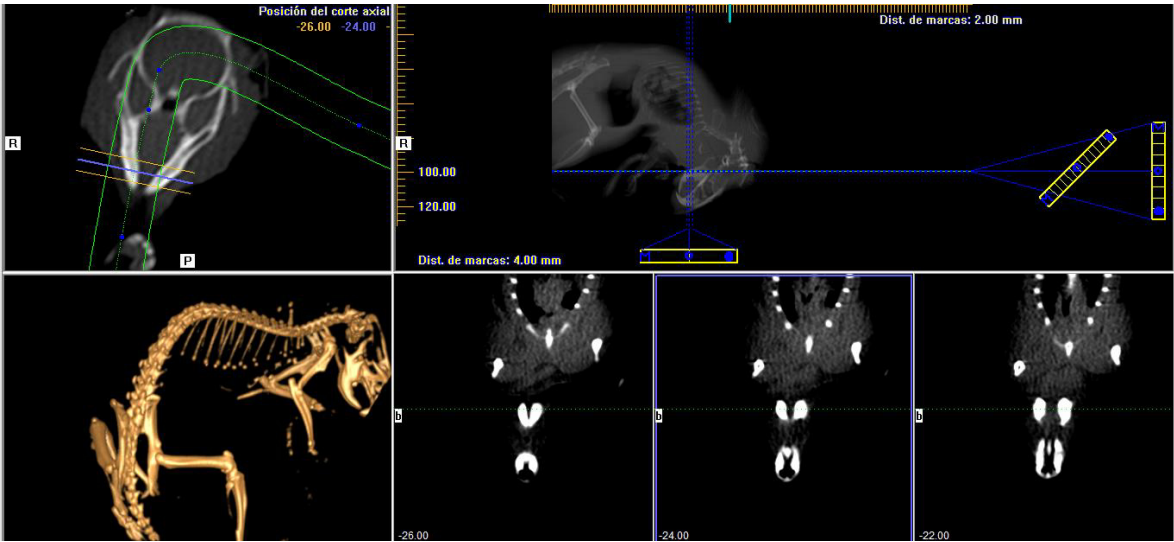
Rata número 25. Grupo Control positivo



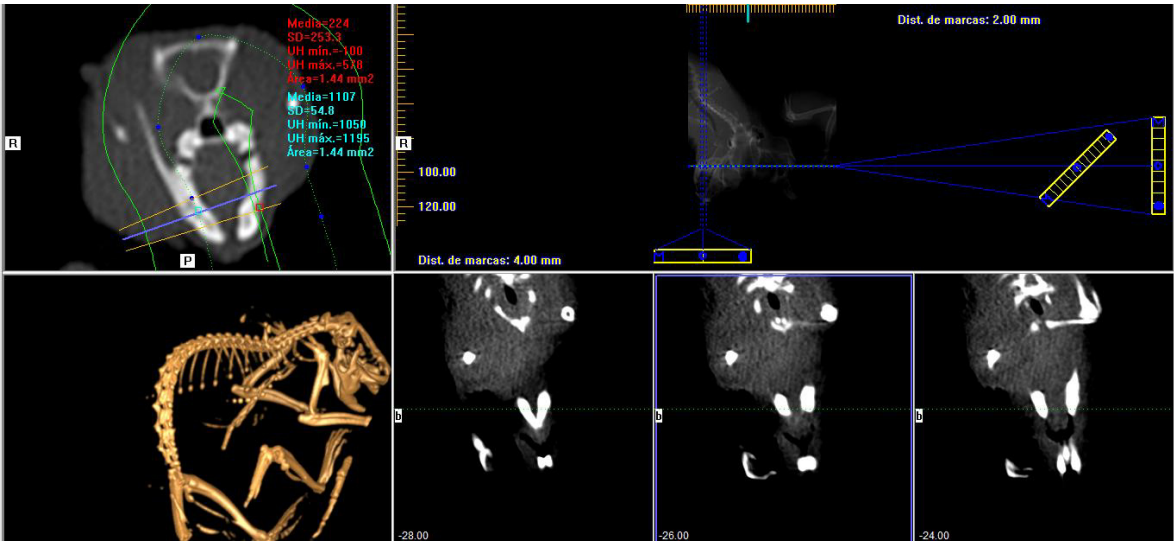
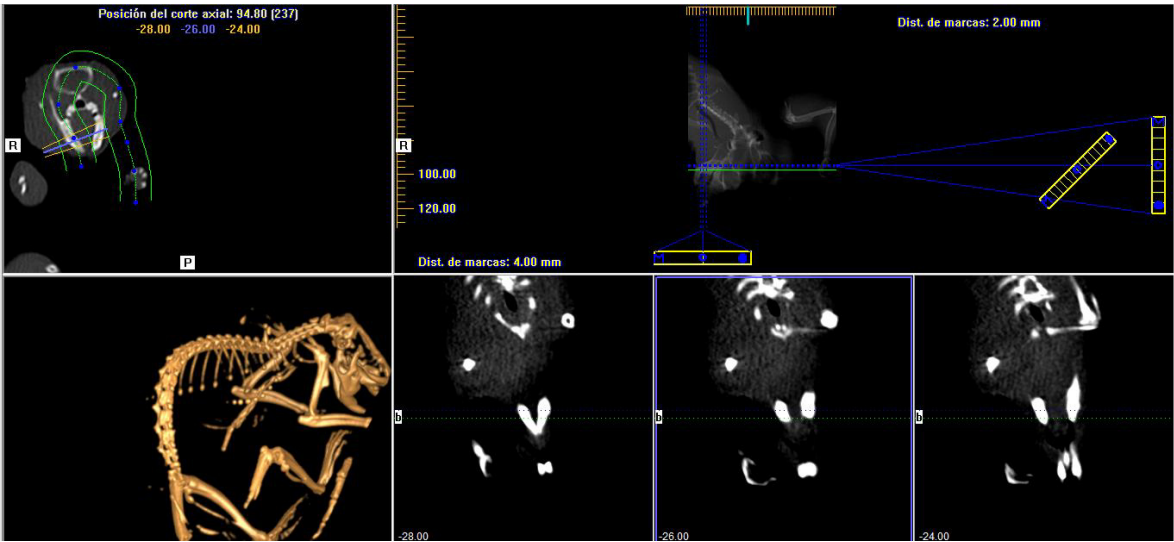
Rata número 26. Grupo Control positivo



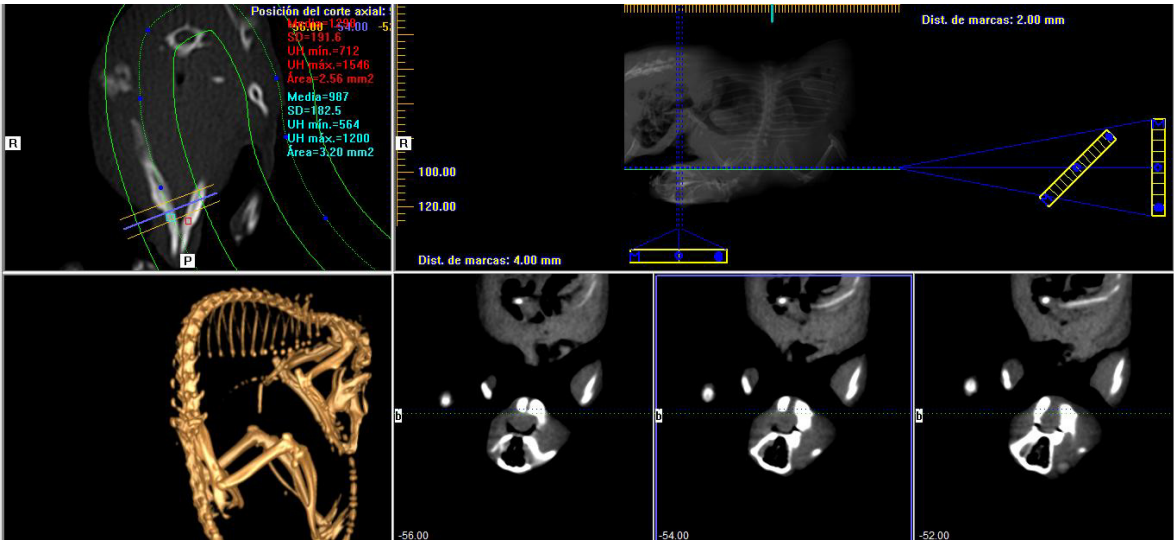
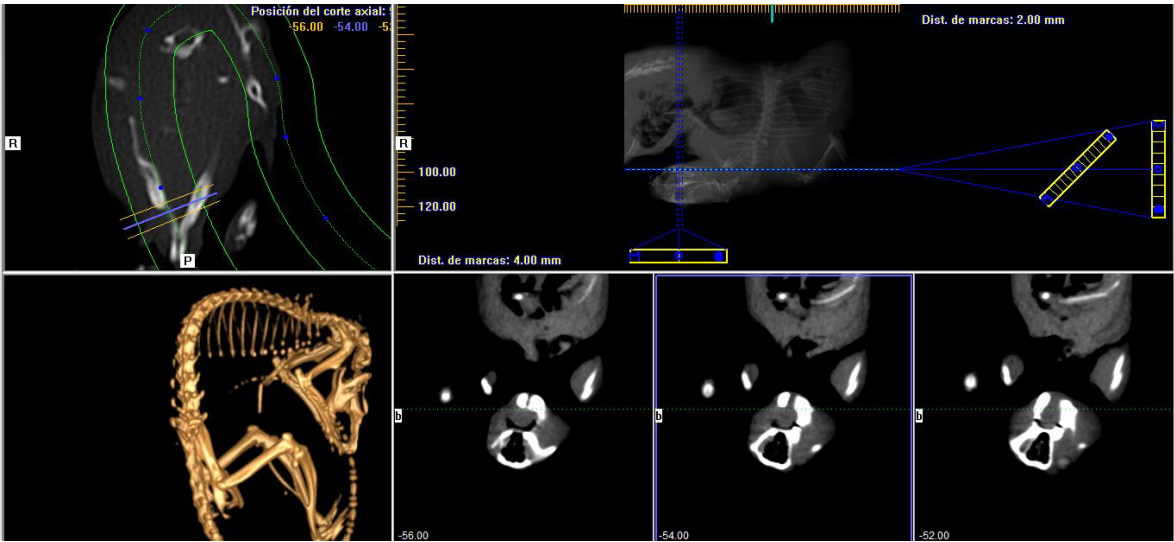
Rata número 27. Grupo Control positivo



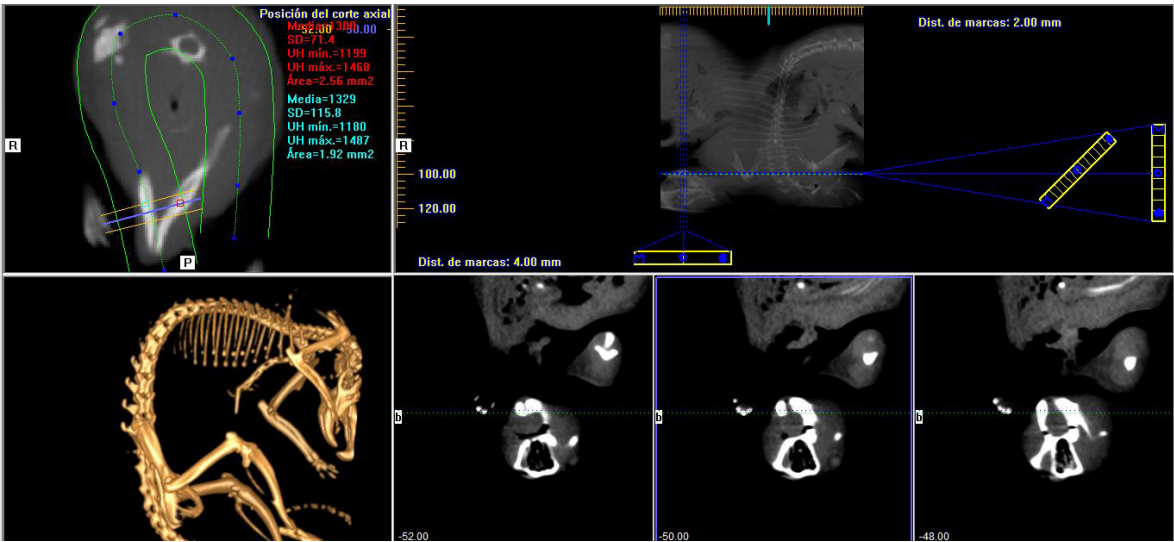
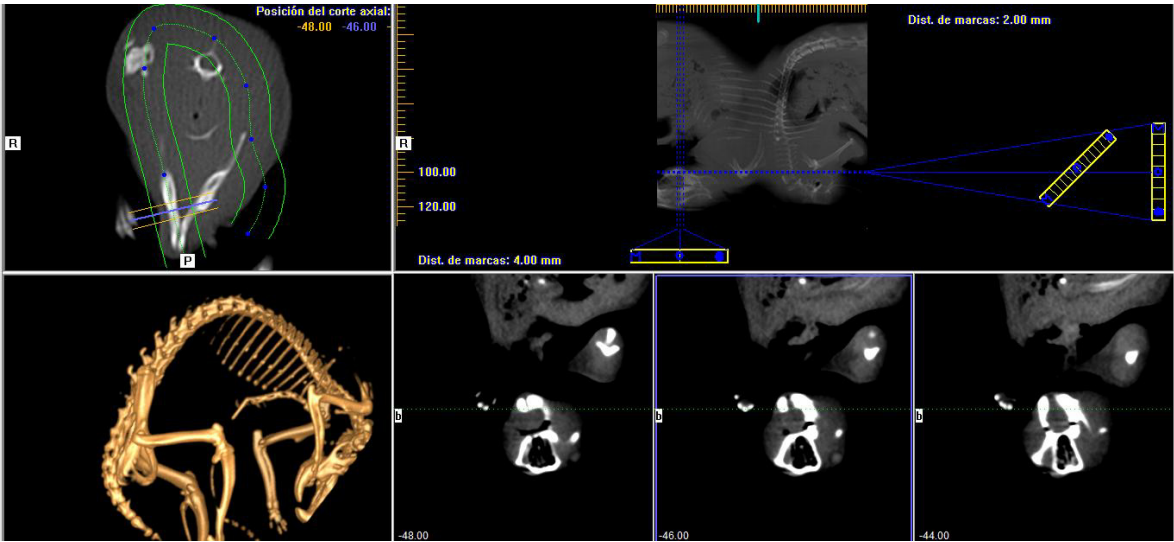
Rata número 28. Grupo Controlpositivo



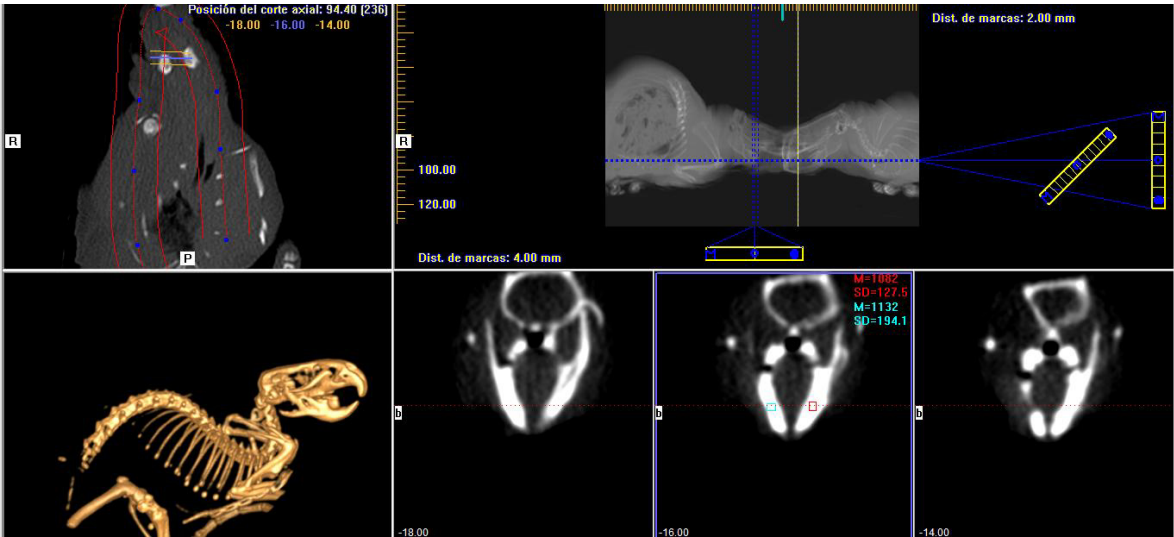
Rata número 29. Grupo Control positivo



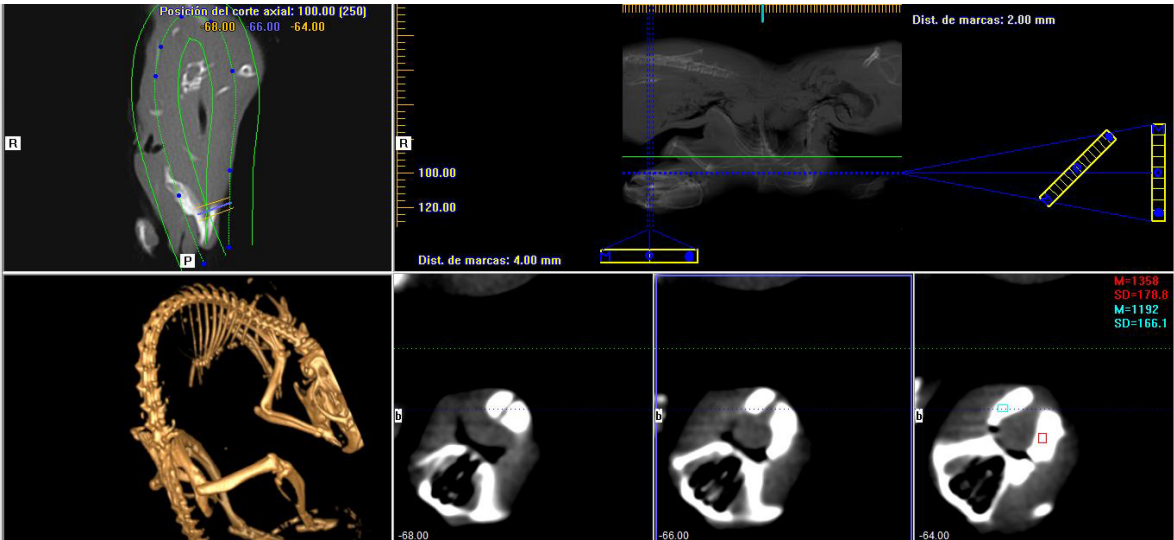
Rata número 35. Grupo Control positivo



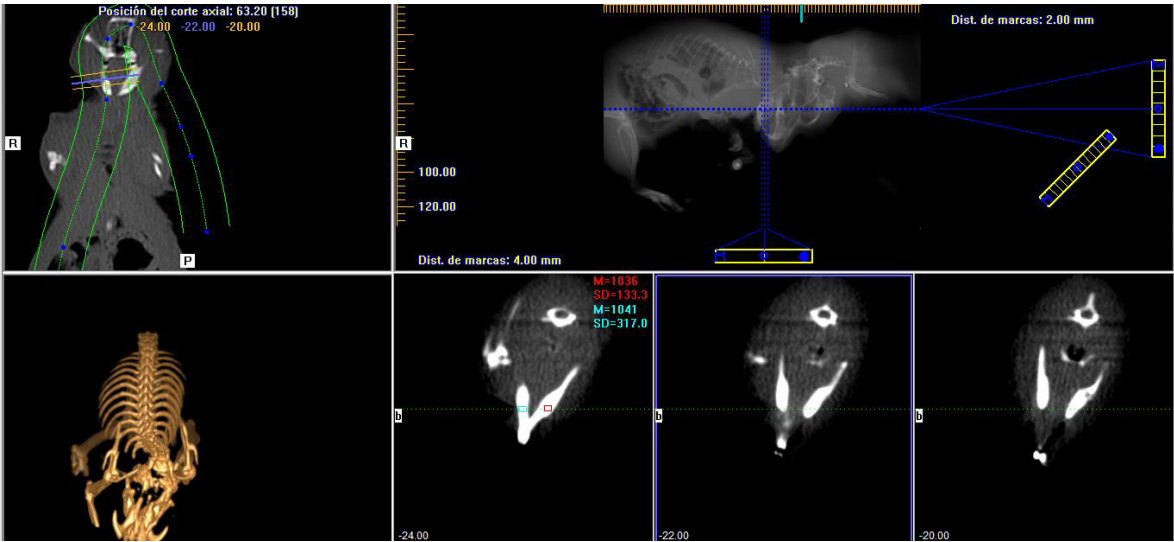
Rata número 9. Grupo Fotocoagulación Laser.



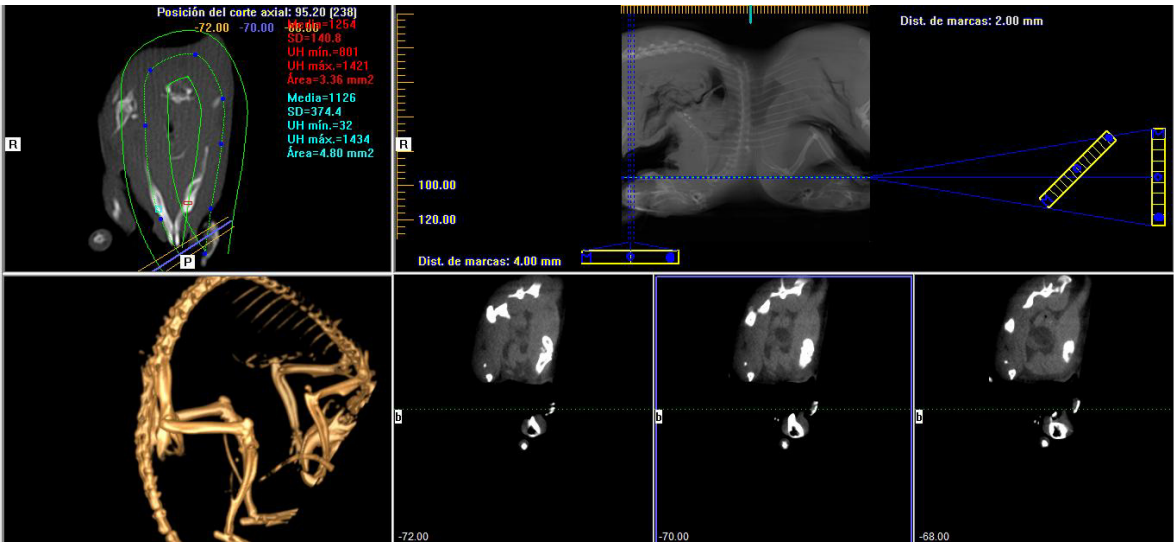
Rata número 12. Grupo Fotocoagulación láser.



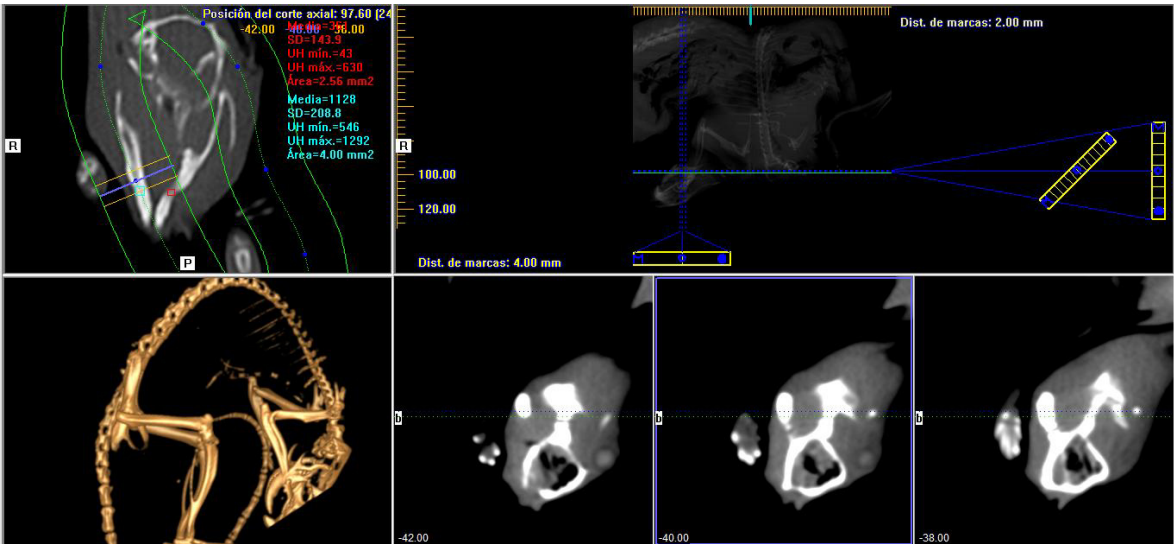
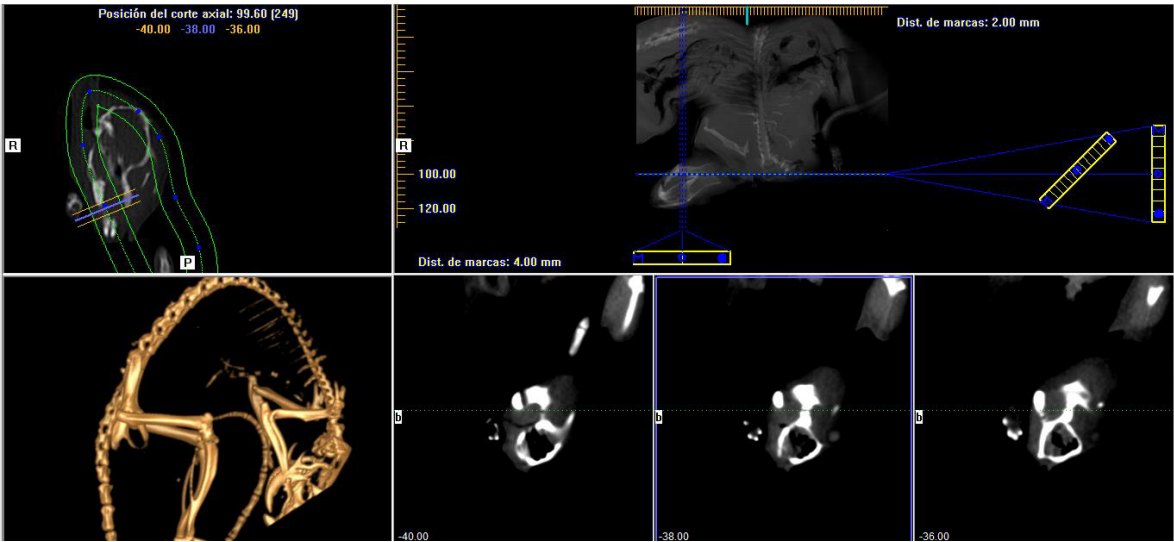
Rata número 31. Grupo Control negativo



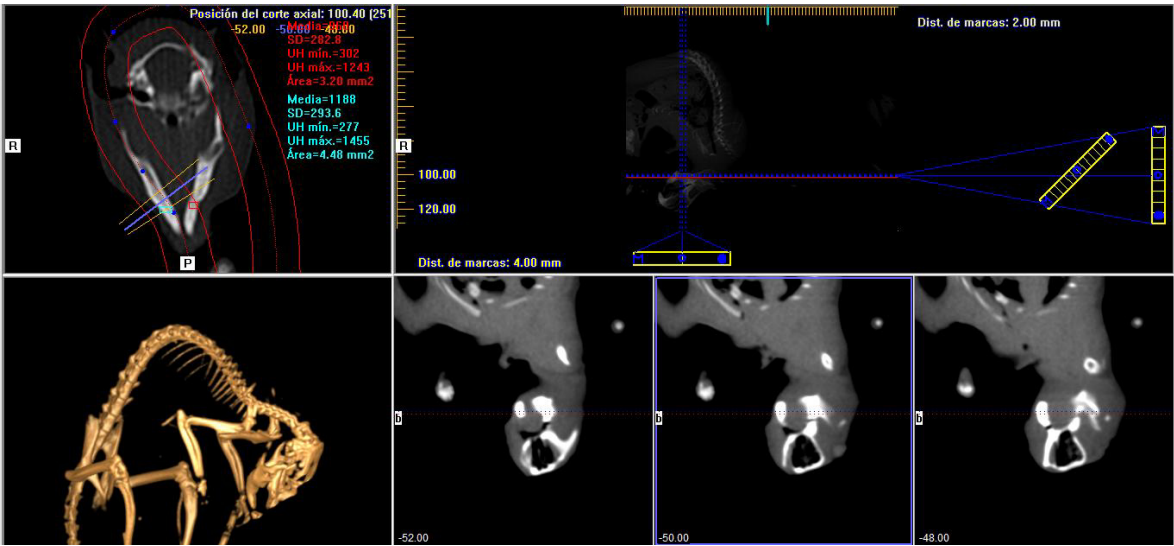
Rata número 36. Grupo Control negativo



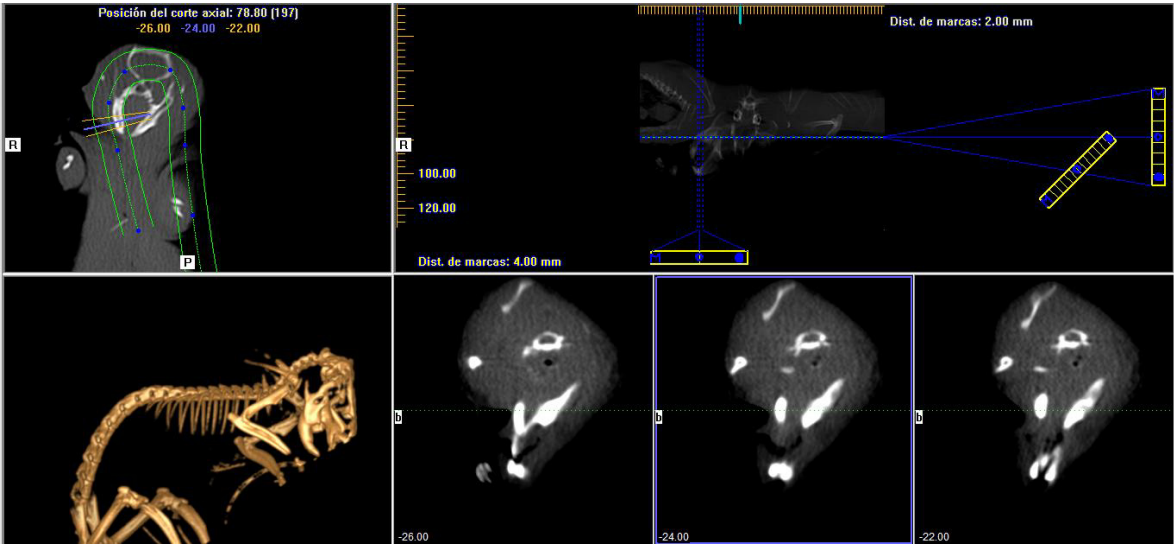
Rata número 34. Grupo Control negativo



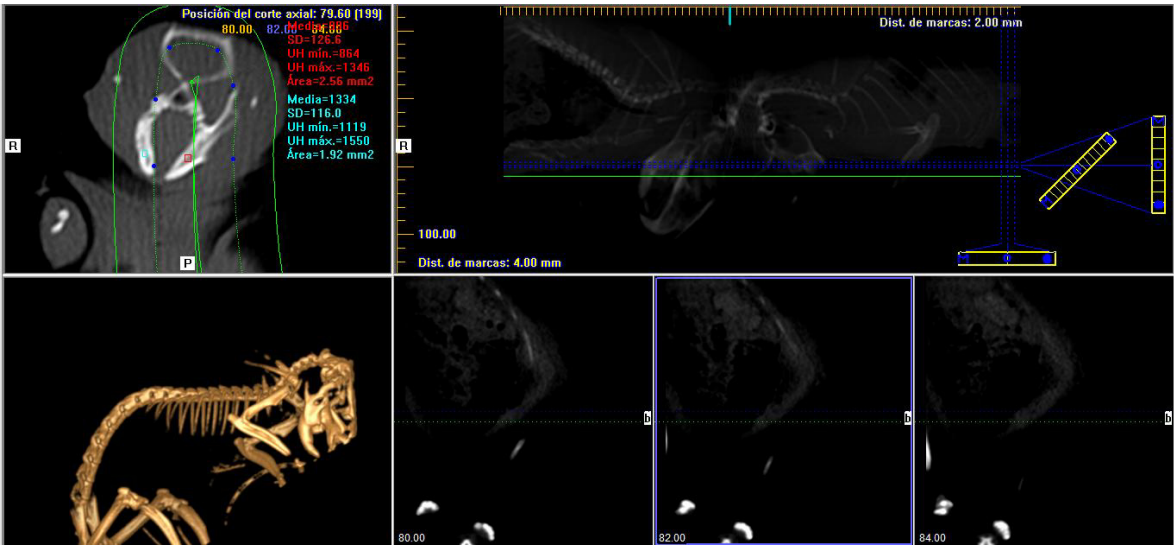
Rata número 33. Grupo Control negativo



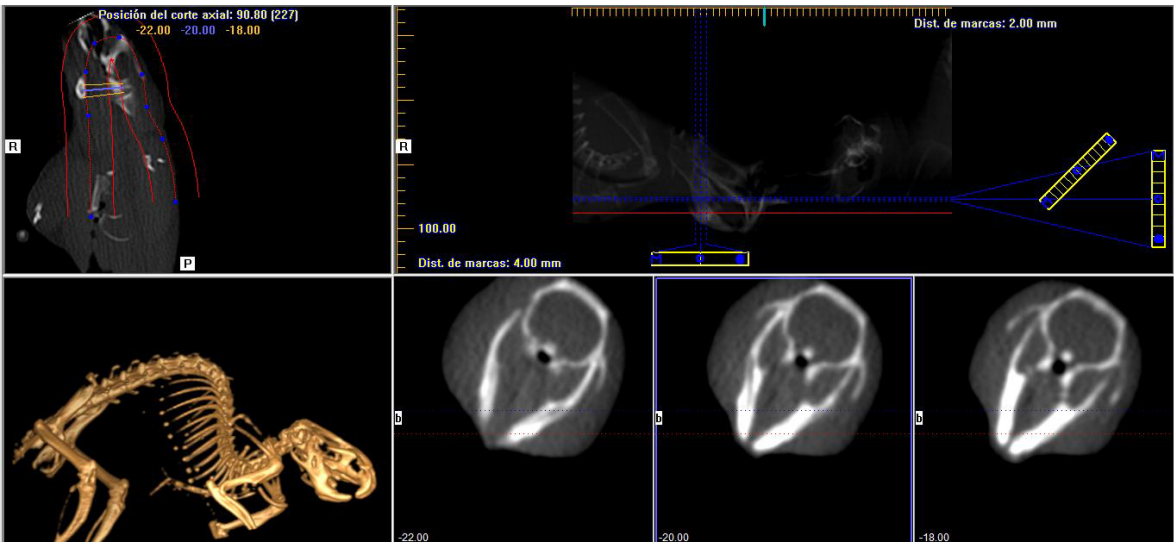
Rata número 32. Grupo Control negativo



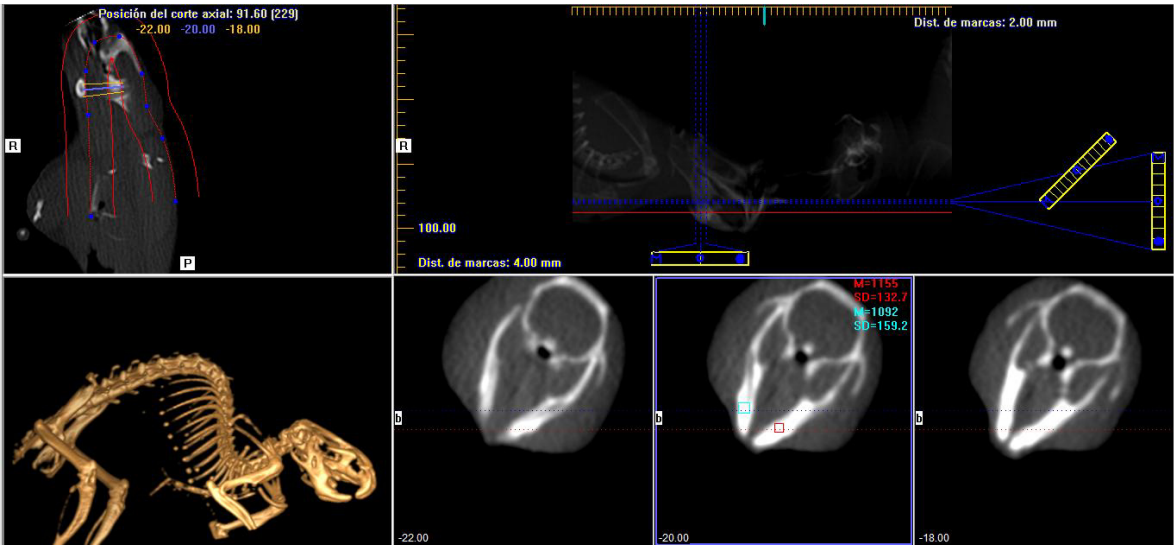
Rata número 32. Grupo Control negativo



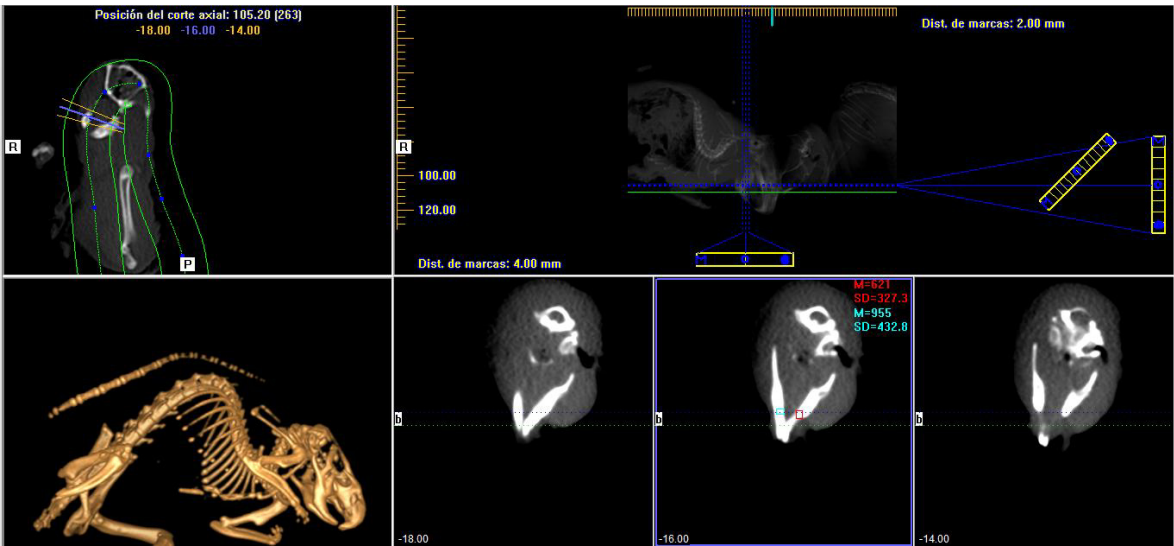
Rata número 14. Grupo Fototermia láser



Rata número 14. Grupo Fototerapia láser



Rata número 16. Grupo Fototerapia láser



Rata número 17. Grupo Fototermia láser

